

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de
La Producción**

Obtención de un hidrolizado proteico utilizando
excedentes de la industria pesquera y agrícola.

TESIS DE GRADO

Previa la obtención del Título de:

INGENIERA DE ALIMENTOS

Presentada por:

Fernanda Stalina Hurtado Angulo

Guayaquil – Ecuador

AÑO

2001

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a todas las personas que me han ayudado para la realización y culminación de este trabajo. Especialmente a la Ing. Aydee Torres Directora de Tesis por su invaluable ayuda, al Ing. Luis Miranda, a mis compañeros del INP, a la empresa Marines por la ayuda prestada en la realización de este trabajo.

**“La razón, es el fundamento de la virtud suprema. La sabiduría, es la voluntad del valor. La superación del apetito, es la base de la prudencia.
De las tres virtues, nace la cuarta que es la justicia”**

Platon.

DEDICATORIA

**A LA MEMORIA DE MI PADRE,
DONDE QUIERA QUE SE
ENCUENTRE. ABOG. JAIME
HURTADO GONZALEZ. POR SU
EJEMPLO DE LUCHA, VALENTÍA Y
SUPERACION.**

**A MI MADRE SOPORTE DE MI
VIDA.**

**A MIS HERMANOS PASTORA Y
LENIN.**

TRIBUNAL DE GRADUACION

Ing. Eduardo Rivadeneira P.
DECANO DE LA FIMCP

Ing. Haydee Torres.
DIRECTORA DE TESIS

Ing. Luis Miranda
VOCAL

Ing. Jorge Duque
VOCAL

DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponden exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL)

Fernanda Stalina Hurtado Angulo.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	II
INDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
SIMBOLOGIA.....	V
INDICE DE FIGURAS.....	VI
INDICE DE TABLAS.....	VII
INTRODUCCION.....	1
I. GENERALIDADES	4
1.1 Producto.....	4
1.2 Materia prima	7
1.3 Proceso de hidrólisis	18
II PRUEBAS EXPERIMENTALES	
2.1 Materiales y métodos	21
2.2 Determinación de los parámetros del proceso.	27
2.3 Formulación del producto	38
2.4 Caracterización del producto.....	40
III PROCESO DE PRODUCCION.	
3.1 Determinación de las operaciones de producción.....	42
3.2 Principales especificaciones del bioreactor.....	53
3.3 Análisis de resultados.....	60

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

ANEXOS

BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS

ADP	Adenosin difosfato
ATP	Adenosin Trifosfato
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Al_2O_3	Oxido de Aluminio.
b	Banano
CO_2	Anhídrido carbónico
CaO	Oxido de calcio.
DIP	Dihidrógeno fosfato
DNA	Acido dextribonucleico.
Fe_2O_3	Oxido de hierro.
5P	5 fosfato
6P	6 fosfato
g	gramo
HEA	Hektoen Enteric Agar
ICMSF	Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para alimentos.
INEN	Instituto Ecuatoriano de Normalización.
Kj	kilojoules
K_2O	Oxido de Potasio
l	litro
mg	miligramo
m.o	microorganismo
pH	potencial de Hidrógeno
ppm	partes por millón.
P_2O_3	Oxido de fósforo
RNA	Acido Ribonucleico.
Rc	Residuos de camarón
Rp	Residuos de pescado
SiO_2	Oxido de Silicio.
UFC	Unidades formadoras de colonias
Y	Yogurth

SIMBOLOGIA

ρ	Densidad
π	Phi
C	Carbono
D	Diámetro
H	Hidrógeno
N	Nitrógeno
O	Oxígeno
Mg	Magnesio
V	Volumen
H	Altura

INDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.1	Camarón <i>Litopenaeus vanamei</i>	8
Figura 1.2	Pescado <i>Thunnus albacares</i>	14
Figura 1.3	Esquema de las vías fermentativas de las bacterias lácticas	20
Figura 2.4	Hongo <i>Penicillium expansum</i>	30
Figura 2.5	Hongo <i>Monillia</i>	32
Figura 3.6	Diagrama de flujo del proceso	47
Figura 3.7	Planta artesanal para la preparación del Hidrolizado proteico.	49
Figura 3.8	Preparación del sustrato	50
Figura 3.9	Adición de Bacterias al sustrato	51
Figura 3.10	Producto terminado	53
Figura 3.11	Agitador de paleta	55
Figura 3.12	Efecto de la temperatura sobre la acidez	61
Figura 3.13	Efecto de la temperatura sobre el pH	62
Figura 3.14	Variación de las B.V.T a diferentes temperaturas	64
Figura 3.15	Recuento microbiológico a diferentes temperaturas	66

INDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla I	Composición química proximal de las cabezas y caparazones de camarón	9
Tabla II	Valor nutritivo del banano Cavendish	10
Tabla III	Composición química del atún entero	11
Tabla IV	Composición bromatologica proximal de la parte no comestible del atún	13
Tabla V	Composición química de la melaza	17
Tabla VI	Resumen de formulaciones realizadas en laboratorio	28
Tabla VII	Características químicas del ensayo 1.	29
Tabla VIII	Características organolépticas del ensayo 1.	29
Tabla IX	Características químicas del ensayo 2.	31
Tabla X	Características organolépticas del ensayo 2	31
Tabla XI	Características químicas del ensayo 3.	33
Tabla XII	Características organolépticas del ensayo 3.	33
Tabla XIII	Características químicas del ensayo 4.	34
Tabla XIV	Características organolépticas del ensayo 4.	35
Tabla XV	Características microbiológicas del ensayo 4.	35
Tabla XVI	Características químicas del ensayo 5.	36
Tabla XVII	Características organolépticas del ensayo 5.	37
Tabla XVIII	Características microbiológicas del ensayo 5.	37
Tabla XIX	Pruebas de cocción.	44
Tabla XX	Tabla comparativa entre hidrolizado obtenido y Requerimientos del lechón	67

INDICE DE CALCULOS

	Pág
Cálculo 1 Cálculo de volumen	56
Cálculo 2 Cálculo de diametro	57

INDICE DE ANEXO

Anexo A	Bases Volatiles Totales. Método por destilación.
Anexo B	Contaje en placa
Anexo C	Determinación de <i>Estafilococos coagulasa</i> .
Anexo D	Determinación de <i>salmonella</i> .
Anexo E	Determinación de <i>shiguella</i>
Anexo F	Determinación de coliformes totales, fecales y <i>Eschericia coli</i> .
Anexo G	Tabla de exportaciones de atun de Enero a Junio del 2000.

RESUMEN.

Esta investigación consistió, en la obtención de un producto para alimentación porcina, a partir de residuos de camarón y atún, mezclados con banano y melaza como fuente de carbono. Se adicionó bacterias lácticas (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) para producir hidrólisis proteica.

Se realizaron 16 pruebas de laboratorio con dos réplicas cada una, para establecer la formulación que diera como resultado un producto estable, libre de patógenos, con características bromatológicas necesarias para la alimentación porcina.

La estabilidad del alimento se alcanza con porcentaje de acidez entre 4.50 y 4,64; pH entre 4.5 y 4.8 y Bases Volátiles totales menor a 30 mg%. La mayor actividad bacteriana se desarrolló a 40°C, sin embargo a 25°C el desarrollo bacteriano también fue favorable.

Finalmente, el bioreactor seleccionado es de tipo tanque, discontinuo, y los agitadores recomendados son de tipo paleta.

INTRODUCCION.

La industria nacional dedicada al procesamiento de productos pesqueros y en especial la industria camaronera, descartan grandes cantidades de desechos sólidos potencialmente valiosos tales como cabezas y caparazones de camarón. A pesar de que las exportaciones de camarón comenzaron a decrecer desde agosto de 1999, debido a la presencia del virus de la mancha blanca (white spot), se reportó en este mismo año un total de 106.281.131,00 libras de camarón cola, 18.971,181.88 representan cabezas, esto significa que existió un total de 3.414.812,738 de proteína cruda (en peso) o 1.548.667.908 toneladas métricas. (13)

La abundancia de estos residuos orgánicos se convierten en un problema ambiental grave al ser eliminados en las laderas de los ríos, originando una alta DBO¹ y por lo tanto bajo fitoplaknton, disminuyendo la biodiversidad de las especies.

Una de las alternativas para evitar este tipo de contaminación es la utilización de la hidrólisis proteica, proceso que consiste en un fraccionamiento de compuestos complejos en compuestos más simples y fáciles de digerir (10).

¹ DBO.- Demanda Bioquímica de Oxígeno expresa el peso de oxígeno necesario para la destrucción, por oxidación bacteriana, de las materias orgánicas contenidas en un líquido.

Este proceso se desarrolló en Dinamarca en el siglo XIX, para luego extenderse en los demás países europeos y asiáticos especialmente, cuyo destino final era la alimentación animal. Como tecnología de procesamiento, diseñada para limpiar el ambiente de residuos de origen pesquero, se aplicó en la recuperación de nutrientes tales como proteínas que se desperdician en grandes volúmenes.

Este proceso puede realizarse ya sea por medios químicos o biológicos. En este proyecto se empleó un método biológico, usando bacterias lácticas en presencia de fuentes de hidratos de carbono como son los excedentes agrícolas, produciendo acidificación del medio e inhibiendo el desarrollo de microorganismos patógenos.(3)

Países como Venezuela, Perú, Uruguay se han llevado a cabo diversas experiencias relacionadas con este tipo de proceso, donde se han usado residuos de cascaras de frutas (piña y papaya) como fuente de enzimas naturales y llevar así la hidrólisis proteica. También existen experiencias de países como Cuba donde la hidrólisis proteica final será llevada para el consumo humano. (5)

En nuestro país existe poca información, relacionada con la hidrólisis proteica, pues solo existe un trabajo realizado en la década de los ochenta

por el Instituto Nacional de Pesca, donde se realizó hidrólisis proteica química usando ácidos orgánicos como el ácido fórmico para obtener la acidez adecuada para la estabilidad del producto (12).

Nuestra investigación consistió en comprobar que estos excedentes son de utilidad para la alimentación animal, realizando pruebas de laboratorio utilizando mezcla de subproductos de camarón, pescado y excedentes del banano en diferentes proporciones, con el fin de obtener un alimento de consumo animal (porcino) que cumpla con los requerimientos necesarios para su alimentación, determinándose los parámetros del proceso y las operaciones de producción a escala piloto.

CAPITULO 1

1. GENERALIDADES

1.1.Producto.

El producto es el resultado de la mezcla de subproductos pesqueros en diferentes proporciones, usando como fuentes de hidratos de carbono banano y melaza, a la cual se le agregado bacterias termófilas provenientes del yogurth (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*) para producir hidrólisis proteica. Para lograrlo se eligieron variables cuantitativas tales como:

- Temperatura
- Tiempo
- Acidez
- pH

Estas variables fueron determinadas para conocer las condiciones optimas para la estabilidad del producto. El producto tiene una consistencia semisólida, homogénea de olor dulce ligeramente fermentado, color marrón, y con una alta humedad.

Las ventajas que presenta este producto son:

- Digestibilidad. Debido a la hidrólisis producida por las bacterias lácticas, que originan un desdoblamiento de las proteínas, y de los carbohidratos presentes en el producto, hace de este un alimento más digerible.
- Inocuidad. Debido a la alta acidez, originado por las bacterias del yogur usado como inóculo, cuyos metabolitos son sustancias antimicrobianas como el ácido láctico, peróxido de hidrogeno, anhídrido carbónico produciendo un efecto inhibitor frente a los microorganismos de la putrefacción tales como salmonellas, shiguellas, coliformes fecales

- Almacenamiento a temperatura ambiente, a pesar de su alto contenido de humedad. (No requiere refrigeración). La estabilidad del producto se debe básicamente a su pH y acidez alta, que impide el desarrollo de microorganismos patógenos.

- Producto microbiológicamente controlado y estable.

- Mínimos requerimientos energéticos en los procesos de producción. A diferencia de otros productos utilizados como piensos no requiere de secado, haciendo que el costo de producción sea mas bajo.

- Utiliza residuos o materias primas subutilizados comercialmente lo que hace que su adquisición sea de bajo costo.

- Proceso industrial que no contamina el medio ambiente. La mayoría de estos materiales usados como insumos para el producto, son eliminados al río, originando un grave problema de contaminación ambiental, pues debido a las proteínas que estos tienen originan un aumento en la carga bacteriana en los ríos y en el mar produciendo que la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) en zonas cercanas a empresas y faenamiento de pescado sea alta.

- Producto nutritivo y de bajo costo en comparación a similares. Una rica fuente proteico – energética capaz de ser usado con las raciones alimenticias del cerdo.

1.2 Materia Prima.

Camarón.

Los residuos de camarón tienen una gran cantidad de componentes especialmente proteínicos, así como otros estimulantes del apetito tales como aminoácidos y nucleotidos, que mejoran considerablemente el valor de la dieta en términos de calidad de la misma (5).

FIGURA 1.1 CAMARÓN *Litopenaeus vanamei*.



FUENTE: REVISTA DE ACUACULTURA. CNA

TABLA I
COMPOSICION QUÍMICA PROXIMAL DE LAS CABEZAS Y
CAPARAZONES DE CAMARON.

COMPOSICIÓN	CABEZAS	CAPARAZONES.
Proteínas	53.5%	22.8%
Grasa	0.8%	0.4%
Cenizas	22.6%	31.7%
Calcio	7.2%	11.1%
Fósforo	1.68%	3.16%

FUENTE: MANUAL PARA MANIPULEO Y PROCESAMIENTO DE
CAMARÓN

Banano.

Los bananos verdes contienen del 20 al 22% de la materia seca, principalmente en forma de almidón. Cuando estas maduran, el almidón se convierte en azúcares simples como: sacarosa, glucosa, y fructosa. Los azúcares presentes en la pulpa del banano maduro, son fácilmente asimilables. Los principales son: sacarosa (66 %), glucosa (20%) y fructuosa (14%). Algunas bananas verdes y maduras tienen un bajo contenido de proteína cruda y son particularmente deficientes en lisina y en aminoácidos azufrados. Para este trabajo usaremos banano maduro como fuente de azúcar (carbohidratos).

TABLA II. VALOR NUTRITIVO DEL BANANO CAVENDISH

Componente	Cantidad
Agua (g)	58 - 80
Fibra (g)	0.3 – 3.4
Almidón(g)	3.0
Azúcar	15.1 – 22.4
Acidez total (meq)	2.9 – 9.1
Cenizas	0.6 – 1.8
Grasas	Trazas 0.4
Proteínas	1.1 – 2.7
Calorías	77 - 116
Acido ascórbico	0 - 31
Carotenos	0.04 – 0.66
Tiamina(mg)	0.02 – 0.06
Riboflavina	0.02 – 0.08
Niacina(mg)	0.04 – 0.08
Acido folico (ug)	10
Piridoxina (mg)	0.5
Vitamina A (UT, unidades intern.)	190
Calcio (mg)	7 -22
Hierro (mg)	0.4 – 1.6
Fósforo (mg)	29
Sodio (mg)	1.0
Potasio (mg)	370.0

FUENTE: BANANO. CULTIVO Y COMERCIALIZACIÓN.

Pescado.

Los residuos son del atún conocido como albacora o yellowfin (*Thunnus albacares*), debido a que este pescado es uno de los de mayor exportación actualmente.

El atún pertenece al grupo de los *teleostei* o peces óseos, sus características biológicas determinan que son peces pelágicos grandes, grasos que almacenan lípidos en sus tejidos. La parte comestible del pescado se encuentra en un rango entre 34 a 65%, lo que significa que un 35% a un 66% se consideran desperdicios. Las características químicas son las siguientes:

TABLA III. COMPOSICION QUIMICA DEL ATUN ENTERO.

	<i>Mín.</i>	<i>Var. Normal</i>	<i>Máximo.</i>
Proteína	6	16 – 21	28
Lípidos	0.1	0.2-2.5	6.7
Carbohidratos		<0.5	1
Ceniza	0.4	1.2-1.5	1.5
Agua	28	66-81	96

FUENTE: ANÁLISIS MODERNO DE LOS ALIMENTOS.

Esta composición varía de acuerdo a la estación, a la edad, sexo, medio ambiente si se encuentra en desove o no. Estas variaciones están estrechamente relacionadas con la alimentación, ya que los peces tienen períodos de inanición por razones naturales o fisiológicas, o por factores como la escasez del alimento.

Las proteínas constituyen uno de los componentes de mayor porcentaje después del agua; La piel, las aletas, las porciones activas de los músculos, los enzimas y hormonas, los pigmentos sanguíneos y musculares, las masas de células hepáticas, y renales y el revestimiento del tracto intestinal son en gran proporción de naturaleza proteica.

El pescado es una de las mejores fuentes de vitaminas y minerales. Los pescados grasos como el atún es rico en vitamina D, la cantidad de vitaminas del grupo B presentes en el pescado son aproximadamente igual a la que se observa en la carne. El pescado, especialmente la parte de la cabeza es una excelente fuente de fósforo y magnesio

El fósforo es un componente de compuestos orgánicos que cumple diversas funciones esenciales entre ellas formación de enlaces ricos en

energía (**ATP**) fosfolípidos de vital importancia en las membranas celulares, lipoproteínas circulantes, componente del material genético (**DNA Y RNA**), formación de compuestos fosforilados intermediarios de los diversos procesos metabólicos de los nutrientes orgánicos, regulación de funciones enzimáticas, etc.

La tabla IV muestra, los porcentajes de humedad, proteína, grasa y cenizas de las partes no comestibles:

TABLA IV. COMPOSICIÓN BROMATOLÓGICA PROXIMAL DE LA PARTE NO COMESTIBLE DEL ATUN

Localización de la rodaja	Humedad %	Proteína %	Grasa %	Cenizas %
Próxima a la cabeza	75.9	18.8	4.8	1.1
Centro	76.2	19.8	3.5	1.2
Próxima a la cola	77.2	19.9	2.6	1.2

FUENTE: MANUAL PARA MANIPULEO Y PROCESAMIENTO DE CAMARÓN.

FIGURA 1.2 PESCADO *Thunnus albacares*



FUENTE: MANUAL DEL INSTITUTO NACIONAL DE PESCA.

Yogurth.

El yogurth comercial está constituido por dos tipos de bacterias que son *Lactobacillus bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus*

Los *Lactobacillus bulgaricus* son bacilos, generalmente largos y delgados, que forman cadenas. Son microaerofilos, aunque existen algunos anaerobios estrictos, catalasa negativo y gram positivos, fermentan los azúcares dando ácido láctico como producto principal.(19). Son homofermentativos es decir que producen mayormente ácido láctico, y únicamente pequeñas cantidades de ácido acético y CO₂ e indicios de otros productos, las temperaturas optimas de crecimiento es de 37°C o incluso superiores.

Otro de los productos originados por los *Lactobacillus* es el peróxido de hidrogeno, que se produce por carecer del enzima peroxidasa, este peróxido es efectivo para inhibir el crecimiento de los patógenos *Pseudomonas* y *Staphylococcus aureus*.

Los ***Streptococcus*** desde el punto de vista alimenticio se clasifica en cuatro grupos; piogenos, viridans, lactivos y enterococos.

En el grupo *viridans* se encuentran los *Streptococcus thermophilus*, los cuales se multiplica bien entre 37 y 40°C, pero también se desarrolla a

50°C. Es una especie homofermentativa termoresistente, que sobrevive a un calentamiento a 65°C durante 30 minutos. Es acidificante, es microaerofilo y soportan muy bien los medios ácidos (pH 4 a 4,5) El ***Streptococcus thermophilus*** y el ***Lactobacillus bulgaricus*** viven en estrecha simbiosis, pues ambos producen más ácido láctico que cuando crecen aislados.

Melaza.

La melaza, un subproducto de la producción del azúcar, es una de las fuentes más baratas de carbohidrato. Además de una gran cantidad de azúcar, las melazas contienen sustancias nitrogenadas, vitaminas y elementos traza. (6)

La composición de la melaza puede variar debido a la materia prima utilizada para la producción de azúcar, las condiciones climáticas, el proceso de producción de cada factoría, y en especial de la localidad.

La melaza cuenta con aproximadamente 14% de glucosa libre, aparte de un 35% de sacarosa en su composición, un máximo de 25% de agua, y un 5% de cenizas y las bacterias posiblemente tienden a atacar primero la glucosa libre y luego desdoblar la sacarosa.

TABLA V. COMPOSICION QUIMICA DE LA MELAZA.

Composición	Melazas de azúcar de caña
Materia seca	77 - 84
Sacarosa	33.4
Rafinosa	-
Azúcar invertido	21.2
Materiales	
N	0.4 – 1.5
P ₂ O ₃	0,6 –2,0
CaO	0.1 – 1.1
MgO	0.03 – 0.1
K ₂ O	2.6 – 5.0
SiO ₂	-----
Al ₂ O ₃	-----
Fe ₂ O ₃	-----
Tiamina ug/100g	830
Riboflavina peso	250
Piridoxina seca	650
Niacinamida	2100
Acido pantotenico	2140
Acido folico	3,8
Biotina	120

FUENTE: MANUAL DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL.

1.3 Proceso de hidrólisis

El término hidrólisis se refiere generalmente a reacciones que intervienen agua y en la que se producen dos o más compuestos, ninguno de los cuales contienen todos los componentes de la sustancia reaccionante.

Los elementos orgánicos presentes van a constituir el sustrato sobre el cual van a actuar los microorganismos o enzimas para convertirlo en moléculas de degradación más simples y como fuente de energía para su supervivencia. Este proceso produce compuestos abundantes como azúcares, aminoácidos, compuestos nitrogenados y nucleótidos, todos los cuales entrarán en el proceso de fermentación siguiendo varias vías catabólicas.

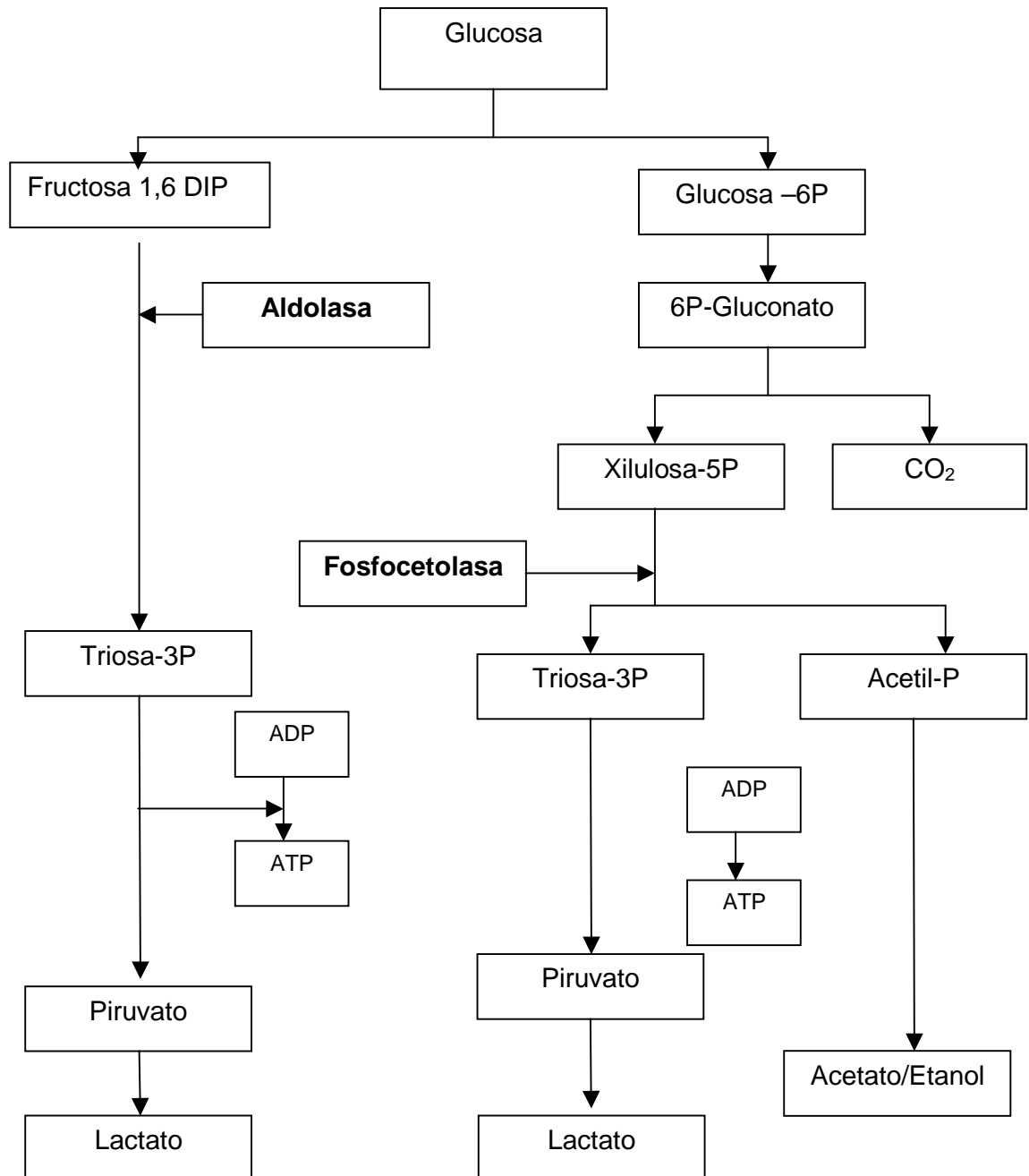
Existen dos mecanismos o vías claramente definidos estos son: Vía homoláctica y vía heteroláctica. Por el tipo de bacterias a usarse el proceso va a ser homoláctico.

Fermentación Homoláctica.

También conocida como vía *Embden-Meyerhof*. Consiste en la formación a partir de la glucosa de una serie de metabolitos intermediarios como la hexosa difosfato (fructosa 1-6 difosfato) que es dividida en dos triosas fosfato por la acción de una enzima llamada fructosa 1 – 6 difosfato

aldolasa. De estas triosas se genera el piruvato y el ácido pirúvico el cual es reducido con dos tipo de enzimas lácticas deshidrogenasas para formar el ácido láctico en forma espacial dextrogira y levógira, producto terminal de ésta fermentación. (2)

FIGURA 1.3 ESQUEMA DE LAS VÍAS FERMENTATIVAS DE LAS BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS.



FUENTE: CONTROL E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS.

CAPITULO 2.

2. PRUEBAS EXPERIMENTALES.

2.1 .Materiales y Métodos

Se realizó un estudio descriptivo experimental, en laboratorio para establecer las materias primas a utilizar. Los datos recolectados fueron tabulados en el programa Excel 97.

El criterio de inclusión fueron todos aquellos residuos de pescados, camarón y calamar recién procesados y que carecían de partes descompuestas y olores desagradables provenientes de la descomposición de los mismos.

En el criterio de exclusión se encuentran las cabezas y residuos de camarón que presentaban más de 150 ppm de metabisulfito de sodio ya que este actúa como

inhibidor de los enzimas y de las bacterias. También se excluyó yogurth azucarados (sacarosa) y aquellos de dieta.

El pescado empleado fue el atún conocido como albacora (*Thunnus albacares*);, utilizado para la elaboración de lomos precocidos y enlatados. El rendimiento de estos procesos representa el casi 50%, el restante consta principalmente de cabeza, vísceras, cola, espinazo, piel, conjuntamente con el pescado que ha sido golpeado durante el transporte hasta la planta procesadora.

Estos residuos provienen de las diversas plantas procesadoras de atún que se encuentran en las provincias de Guayas y Manabí, especialmente en Manta.

El traslado se lo realizó en termos con paquetes de glicol congelado para su mejor preservación y así evitar el deterioro de las proteínas por altas temperaturas y finalmente fueron almacenados en un congelador con una temperatura no mayor a -5°C , hasta su procesamiento.

Los residuos de camarón, que constan principalmente de cabezas pertenecen de la especie *Litopenaeus vanamei*; son camarones de acuicultura, provienen de las distintas empacadoras que exportan camarón cola principalmente a los Estados Unidos, cabe indicar que la cantidad de caparazones utilizados es mínima, debido a que la mayoría de las exportaciones es de camarón entero o camarón cola por lo cual conservan su caparazón.

Estos residuos fueron recolectados en gavetas con hielo en la planta de proceso y posteriormente almacenados en un congelador con temperaturas no superior a -5°C , temperaturas necesarias para inactivar los enzimas.

Las cabezas de camarón, no pueden ser almacenados por más de una semana, debido a que comienza el deterioro llamado melanosis, que es un proceso deteriorativo causado por la actividad enzimática sobre las proteínas que contienen, presentándose puntos o manchas negras y posterior demorfación de la cabeza del camarón. La utilización de las cabezas de camarón con melanosis, adicionaría enzimas no deseables en el proceso provocando putrefacción del producto.

El banano, proveniente del excedente no exportable, fue adquirido en los distintos puestos de venta de ésta fruta. Debe tener una consistencia firme y un color amarillo que nos indique que la fruta se encuentra en un estado de madurez óptimo para el proceso, pues este va a ser una de nuestras fuentes de carbohidratos (sacarosa, glucosa, fructosa) y por lo tanto debe estar carente de almidón, ya que el almidón es un carbohidrato no fácilmente hidrolizable.

El banano pertenece a la especie *cavendish*, se lo mantuvo en refrigeración por un día, tiempo máximo para evitar quemaduras por frío. Del banano se utilizó en principio la cáscara y el fruto en sí, pero la presencia de taninos en la cáscara actuó como un inhibidor del crecimiento bacteriano.

El yogurth utilizado, es un producto de formula comercial preparado en las distintas empresas lácteas de la ciudad, también se utilizó yogurth de preparación reciente de la planta piloto de Daule de cepa certificada para evitar interferencia de algún otro tipo de bacteria que no sean la bacteria *Lactobacillus lactis* y el *Streptococcus thermophilus* usado para la elaboración del yogurth, debe mantenerse refrigerado hasta el momento de la elaboración del producto, en el caso del yogurth preparado en la planta piloto de la planta de Daule, este debe tener no más de dos días de preparación, porque de esta manera aseguramos que las bacterias se encuentra en la etapa de crecimiento, momento óptimo para inocular.

La melaza fue recolectada en los Ingenios que se encuentran en la provincia de Guayas, también fue transportada desde el cantón Chone (provincia de Manabí) en tanques limpios y sellado con capacidad de 4 galones.

Los materiales como molino, espátulas, beaker, agitadores de vidrio, deben ser lavados con pequeña cantidad de jabón para evitar que los residuos de detergente actúen como inhibidor de la actividad microbiana, lavados con agua caliente y fría para producir un choque térmico y evitar que intervengan otras bacterias en el proceso.

Métodos.

Los métodos físicos – Químicos para determinar Humedad, Cenizas, Grasas y Proteínas fueron realizados según la AOAC. 1996. Calcio según método INEN 546.

Bases volátiles totales por destilación, pH por el potenciómetro digital de lectura directa marca Corning, Acidez titulable. Método 15.004 (AOAC) 1996.

Microbiológicos. Métodos ICMSF (Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos.)

- | | |
|---------------------------------|--|
| ▪ Contaje de aerobios. | Diluciones seriadas Agar PCA. |
| ▪ <i>Estafilococos aureus</i> . | Agar Parker. |
| ▪ <i>Salmonella</i> .- | Preenriquecimiento con agua
Buferada en caldo
tetracionato.
Aislamiento.- Lisina, Xilosa,
desoxicolato |

- *Shiguella*. HEA.(Hektoen Enteric Agar)
Selenita
- Coliformes totales.- Tubos múltiples.
- *Eschericia coli*. Agar EMB. (Eosina Azul de Metileno).

2.2. Determinación de los parámetros del Proceso.

Para determinar las variables del proceso se realizaron diversos ensayos en el laboratorio, consistentes en 2⁴ (16) pruebas en laboratorio con 3 réplicas cada una. Conociendo que uno de los productos desarrollados por estos microorganismos es el ácido láctico consideramos la acidez como nuestro principal parámetro conjuntamente con el pH, y Bases Volátiles Totales, como índice de deterioro. Se procedió a incubarlas a temperaturas de 37°C, 40°C, por 48 horas. También se hicieron ensayos a temperatura ambiente que varió entre 26°C y 28°C por 48 horas. La acidez nos da un indicio de la producción de ácido láctico, ácido que permitirá la estabilidad del producto.

De las 16 pruebas realizadas, las primeras cuadro con sus respectivas réplicas se utilizó calamar, pero la falta de materia prima hizo descartar esta materia; en las siguientes se hizo ensayos con residuos de camarón sin residuos de pescado y luego con residuos de pescado; La tabla VI resume los 5 ensayos que más información dieron a este estudio.

TABLA VI. RESUMEN DE FORMULACIONES REALIZADAS EN LABORATORIO.					
ENSAYOS	%CAMARÓN	%PESCADO	%BANANO	%MELAZA	%YOGUR TH
1	75		15		10
2	40	35	15		10
3	40	35	15		10
4	40	35	15	7	3
5	40	35	15	7	3

TABLA VII. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL ENSAYO 1

Días	pH	Acidez (% ac. Láctico)	B.V.T.(mg%)	Temperatura
1	6.8	0.252	11.20	37°C
2	5.0	0.42	25.00	37°C
3	4.9	1.68	130.00	27°C

TABLA VIII. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL ENSAYO 1.

DÍAS	COLOR	OLOR	APARIENCIA
1	Anaranjado	Banano	Sólido

2	Anaranjado	Lig. Fermentado	Semi- sólido
3	Anaranjado	Fuertemente fermentado Lig. pútrido	Mayor presencia de liquido.
4	Anaranjado	Pútrido	Presencia de hongos.

FIGURA 2.4 HONGO *Penicillium expansum*



FUENTE: FOTO TOMADA EN PRUEBAS DE LABORATORIO

TABLA IX. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL ENSAYO 2

Días	pH	Acidez (% ac. Láctico)	B.V.T. (mg%)	Temperatura
1	6.5	0.252	13.10	37°C
2	4.8	0.783	30.15	37°C
3	4.5	1.68	105.00	37°C
4	4.5	2.35	140.20	37°C

TABLA X. CARACTERÍSTICAS ORGANOLEPTICAS DEL ENSAYO 2.

DIAS	COLOR	OLOR	APARIENCIA
------	-------	------	------------

1	Anaranjado	Banano	Sólido
2	Anaranjado	Lig. Fermentado	Semi- sólido
3	Anaranjado	Fermentado	Mayor presencia de liquido
4	Anaranjado	Fuertemente fermentado Lig. pútrido	Mayor presencia de liquido.
5	Anaranjado	Pútrido	Presencia de hongos.

FIGURA 2.5 HONGO *Monillia*



FUENTE: FOTO TOMADA EN PRUEBAS DE LABORATORIO.

TABLA XI. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL ENSAYO 3.

Días	pH	Acidez (% ac. Láctico)	B.V.T. (mg%)	Temperatura
1	7.05	0.26	13.20	40°C
2	4.11	1.34	16.14	40°C
3	4.55	2.07	16.13	26°C
4	4.45	1.04	24.57	26°C

TABLA XII. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL ENSAYO 3.

DIAS	COLOR	OLOR	APARIENCIA
------	-------	------	------------

1	Anaranjado	Camarón cocinado	Semi -sólido
2	Anaranjado (café en la superficie)	Camarón cocinado	Semisólido
3	Anaranjado	Fermentado	Mayor presencia de líquido
4	Anaranjado	Fuertemente fermentado Lig. pútrido	Mayor presencia de líquido.
5	Anaranjado	Pútrido	Presencia de hongos.

TABLA XIII. CARACTERISTICAS QUIMICAS DEL ENSAYO 4.

Días	pH	Acidez (% ac. Láctico)	B.V.T. (mg%)	Temperatura
1	7.15	0.25	13.20	40°C
2	4.44	1.36	19.25	40°C
3	4.46	1.43	28.00	26°C
4	4.45	2.58	21.00	26°C
8	4.45	4.58	19.20	26°C
10	4.50	4.60	19.15	26°C
15	4.51	4.60	20.00	26°C
30	4.52	4.68	19.28	26°C

45	4.55	4.68	22.00	26°C
50	4.54	4.70	22.15	26°C
60	4.58	4.48	20.00	26°C

TABLA XIV. CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS. DEL ENSAYO 4.

Días	Color	Olor	Textura
1	Café oscuro	Dulce de banano	semisólida
2	Café oscuro	melaza	Semisólida
3	Café oscuro	Melaza	Presencia de hidrólisis
4	Café oscuro	Agridulce	Mayor presencia de hidrólisis
8	Café oscuro	Agridulce	Textura constante
10	Café oscuro	Lig. fermentado	Textura constante
15	Café oscuro	Lig. fermentado	Textura constante
30	Café oscuro	Lig. fermentado	Textura constante

45	Café oscuro	Lig. fermentado	Textura constante
50	Café oscuro	Lig. fermentado	Textura constante
60	Café oscuro	Lig. fermentado	Textura constante

TABLA XV. CARACTERISTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL ENSAYO 4.

Días	Recuento de aerobios
4	20×10^3
30	54×10^2
60	13×10^4

TABLA XVI CARACTERISTICAS QUÍMICAS DEL ENSAYO 5.

Días	pH	Acidez (% ac. Láctico)	B.V.T. (mg%)	Temperatura
0	6.0	0.88	14.48	41°C
1	4.5	1.93	52.86	40°C
2	4.50	2.40	73.81	26°C
3	4.40	4.23	48.76	26°C
4	4.45	4.50	30.72	26°C
8	4.45	4.58	27.28	26°C
10	4.50	4.60	27.50	26°C
15	4.51	4.60	27.30	26°C

30	4.73	4.68	27.89	26°C (temp. amb)
45	4.55	4.68	28.90	26°C (temp. amb)

TABLA XVII. CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS DEL ENSAYO 5.

Días	Color	Olor	Textura
0	Café oscuro	Dulce de banano	semisolida
1	Café oscuro	melaza	Semisolida
2	Café oscuro	Melaza	Presencia de hidrólisis
3	Café oscuro	Lig. Fermentado	Mayor presencia de hidrólisis
4	Café oscuro	Lig. fermentado	Masa homogénea
8	Café oscuro	Lig. fermentado	Masa homogénea
10	Café oscuro	Lig. fermentado	Masa homogénea
15	Café oscuro	Lig. fermentado	Masa homogénea

30	Café oscuro	Lig. fermentado	Masa homogénea
45	Café oscuro	Lig. fermentado	Masa homogénea

TABLA XX. CARACTERISTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL ENSAYO 5.

Días	Recuento de aerobios
1	215×10^4
2	116×10^4
30	106×10^3
<i>Salmonella</i>	negativo.
<i>Shiguella</i>	negativo
<i>Coliformes</i> totales	negativo

2.3 Formulación del producto.

Los microorganismos para crecer, requieren de fuentes de carbono, Nitrógeno (N), Hidrógeno (H), Fósforo (P), Oxígeno (O) y metales trazas tales como: Magnesio, (Mg), Manganeseo (Mn). Cobre, (Cu), Hierro (Fe), Zinc (Zn), Calcio (Ca), Molibdeno (Mo) necesario para el crecimiento.

En la formulación se tomó en consideración la energía a partir de la oxidación de la fuente de carbohidrato proveniente principalmente del banano y la melaza, energía otorgada por el Carbono, (ver tabla V).

Tipo de proceso aeróbico o anaeróbico, es otro factor importante, nuestro proceso es anaeróbico por lo tanto las bacterias aprovechan sólo el 10% del carbono. Se conoce que alrededor del 45 – 50% de la composición de la biomasa esta formado

por carbono. Las bacterias utilizadas en el proceso toman como sustrato la glucosa libre.

Ejemplo:

Si queremos obtener 150g/l de biomasa, el 50% de esto es Carbono es decir 75 g, el 10% por ciento fue aprovechado por las bacterias anaeróbicas, nos indica que 750g de Carbono necesitamos para obtener una biomasa de 150 g/l.

Las bacterias utilizadas en nuestro estudio aprovecha la glucosa libre; La glucosa es un monosacarido cuya fórmula es:

$C_6H_{12}O_6$; el peso molecular del Carbono es 12 multiplicado por 6 nos da 72; Hidrógeno peso molecular 1 por 12 igual da 12; Oxígeno peso molecular 16 por 6 igual 96, las suma de estas multiplicaciones es igual a 180g. por lo tanto

$$\begin{array}{r}
 180g \text{ (peso molecular de la glucosa)} \text{-----} 72g \text{ (Carbono)} \\
 X \text{-----} 750g \\
 \hline
 1875g
 \end{array}$$

Este valor lo dividimos para el peso de una molécula de glucosa así tenemos:

$$1875g/180g = 10.42= 11 \text{ moléculas de glucosa.}$$

Estas 11 moléculas se logró obtener, con la adición de melaza (ver tabla V). En cuanto a los requerimientos de Nitrógeno y los demás elementos, esto fue suministrado por los residuos de pescado y de camarón (ver tabla I y IV). El cálculo principal es la cantidad de Carbono requerido para el metabolismo de las bacterias.

2.4 CARACTERIZACION DEL PRODUCTO.

Las características del producto son:

- **Composición:**

Residuos de camarón	40%
Residuos de pescado	35%
Yogurth	3%
Melaza	7%
Banano	15%

- Densidad (ρ) = 2.2g/ml

- Sólidos = 30%.

Organolepticas:

- Semi - sólido
- Olor Fermentado
- Color marrón oscuro

Químicas:

- Un pH que varia entre 4.5 y 4.8
- Acidez que varia entre 4.50 y 4.68% ácido láctico.
- Bases volátiles totales 19.00 y 30.00 mg%

Bromatologicas.

- Humedad varia entre 68 – 75%
- Cenizas entre 2. 5 y 3.57%

- Proteínas entre 13.51 y 16.00%
- Grasa 2.00 y 3.00%
- Calcio entre 0.46 y 0.5

Microbiológicas.

- *Salmonellas* ausencia
- *Shiguellas* ausencia
- Hongos ausencia
- Coliformes totales ausencia
- *Eschericia coli* ausencia
- *Estafilococos aureus* ausencia
- Aerobios entre $20 \times 10^3 - 215 \times 10^4$ (UFC/g)

CAPITULO 3.

3.PROCESO DE PRODUCCION.

3.1Determinación de las operaciones de producción.

Se determinaron que las operaciones básicas para producir la hidrólisis proteica, son las siguientes:

Recepción, cocinado, molido, mezclado, incubado, obtención del hidrolizado, para finalmente ser empacado y almacenado a temperatura ambiente.

Recepción.

Los residuos son recolectados de las distintas enlatadoras y empacadoras, pesados y troceados en especial cuando se trata de cabezas de pescado.

Cocción.

El objeto de la cocción fue la destrucción de patógenos tales como *coliformes fecales*, *estafilococos* y la familia de los *vibrionaceos*, microorganismo que se encuentran como flora natural o que se adicionan durante la manipulación de la materia prima. Todos estos enteropatógenos son sensibles al calor, por lo que pueden destruirse a 72°C.

Por seguridad se seleccionó una temperatura de 100°C; Para determinar el tiempo de cocción se tomaron variables cuantitativas como el porcentaje de proteínas y número de microorganismos eliminados y una variable cualitativa (textura).

Los tiempos tomados como referencia fueron: 10, 15 y 20 minutos. Los resultados fueron:

TABLA IX. PRUEBAS DE COCCIÓN

Tiempo (minutos)	% Proteínas	No. de aerobios (UFC/g)	Textura.
10	16%	4.8×10^4	Firme
15	16%	2.6×10^2	Mas blanda
20	13%	35x10	Ligeramente pastosa

La cocción se lo realizó artesanalmente, en ollas de aluminio en cocinados por inmersión en agua en cocinas de gas. Luego de cocinados se realizó un escurrido, para eliminar la mayor cantidad de agua posible. El rendimiento en este paso de fue de 95%

Molido

La molienda de estos residuos se los realizó, en molino de comprensión con criba de 3 a 5 milímetro de diámetro, con la finalidad de que el producto obtenido sea lo más fino posible y así obtener una mejor hidrólisis proteica.

Mezclado

El mezclado se lo realizó con el fin de obtener una masa homogénea, distribuir las bacterias lácticas uniformemente. El tiempo de mezclado

se estimó en 10 minutos, la velocidad de agitación recomendada es de 60rpm (8)

Incubado

El incubado se lo realizó en el bioreactor por un tiempo de 48 horas, tiempo necesario para el máximo desarrollo bacteriano. La temperatura de incubación varió entre 37 y 40°C. aunque también puede desarrollarse a 25°C. Esta temperatura se alcanzo por la temperatura ambiente y el calor generado por las bacterias, no se requirió de un equipo dotado de serpentines o con camisa de vapor. La temperatura se verificó con un termómetro de mercurio, se registro temperaturas cada 8 horas es decir se realizó 6 tomas de temperatura.

Hidrolizado proteico.

Después de incubado se obtuvo el hidrolizado proteico, al cual se le realizó los análisis microbiológicos y químicos necesarios.

Envasado y almacenado.

Se procedió a envasar el hidrolizado en bidones plásticos, previamente lavados con una solución de cloro de 5 ppm y almacenado a temperatura ambiente. El rendimiento del proceso es igual $\text{Producto final (Pf)/Producto inicial (Pi)}$. Red. $\text{Pf/Pi} = 80.08\%$

FIGURA 3.13 DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO

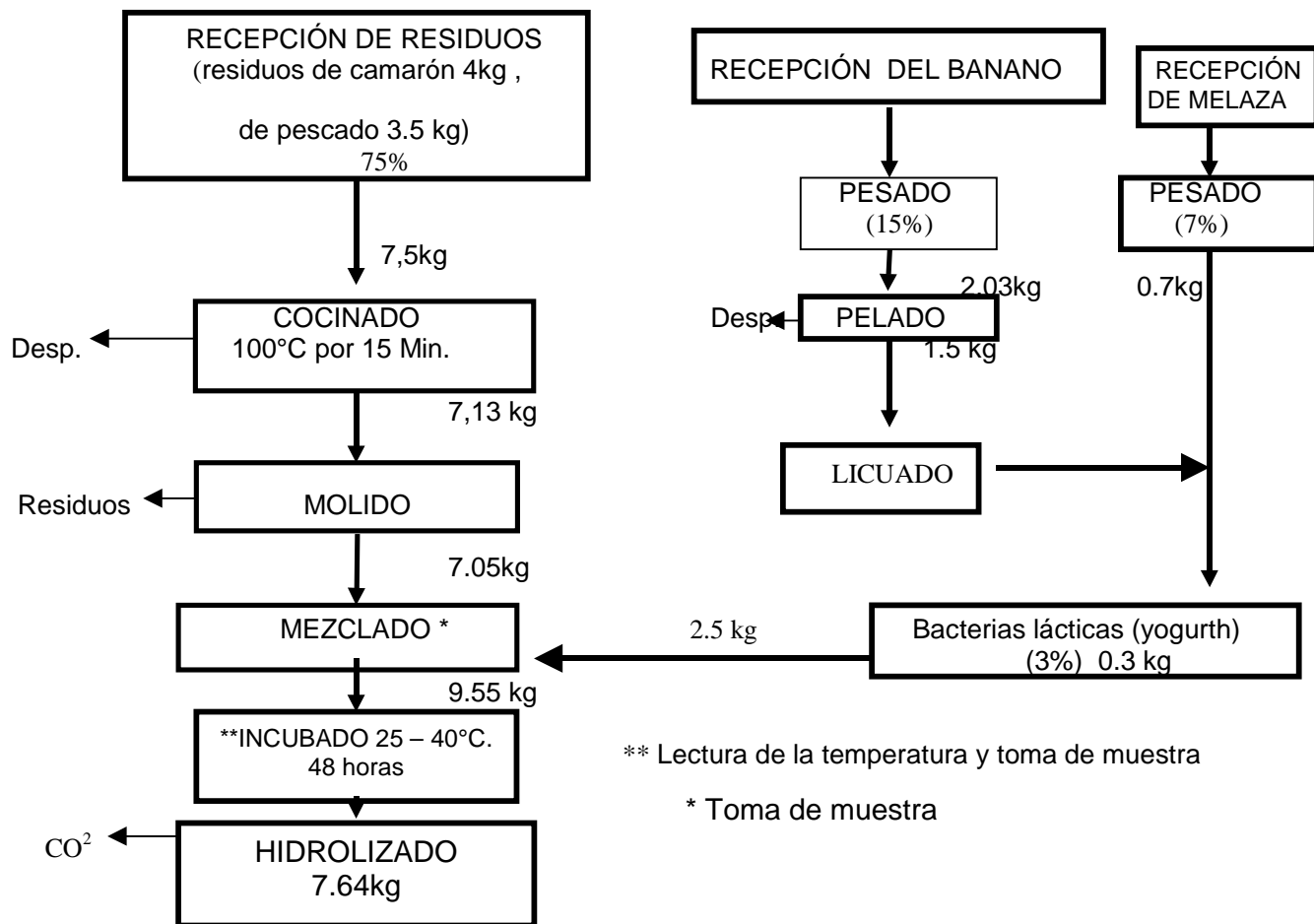


FIGURA 3.7 PLATNA ARTESANAL PARA
PRODUCIR HIDROLIZADO PROTIECO.



FUENTE: FOTO TOMADA EN EL CENAE.

FIGURA. 3.10. PRODUCTO TERMINADO



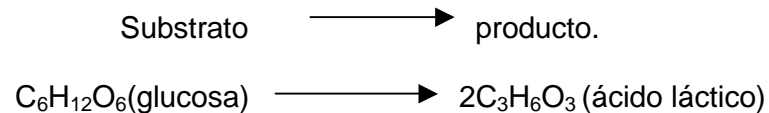
FUE

D.

3.2. Principales especificaciones del Bioreactor.

La selección del bioreactor depende de factores como:

- **Tipo de reacción.** (simple o compleja).- La reacción es de tipo simple es decir:



El producto obtenido en las diversas experiencias deriva directamente del metabolismo primario utilizado para la producción de energía. El crecimiento, el catabolismo del carbohidrato y la formación del producto se llevan a cabo casi en paralelo.

- **Características del proceso.**
 - Proceso discontinuo (batch). No estacionario Requiere de 48 horas para producir el hidrolizado
 - Sistema cerrado. No hay entrada ni salida de componente mientras se produce la reacción.
 - Proceso en ausencia de oxígeno, por lo tanto no aireado.
- **Transferencia de masa.**- Se da durante el crecimiento y metabolismo microbiano, tiene lugar durante la transferencia de nutrientes y

metabolitos entre el medio externo y la célula. En los procesos anaeróbicos la demanda microbiana es cubierta usualmente sin dificultad, ya que según las características de las materias utilizadas, es cubierta. Por lo tanto al no haber oxígeno, la transferencia no es un factor decisivo en la selección del bioreactor.

- **Transferencia de energía.** Durante el metabolismo se produce energía metabólica que se disipa en forma de calor, y tienen a elevar la temperatura del medio, experimentalmente el calor generado por los estreptococos es de 20 --21 kj/gramo(8), más la energía mecánica de los agitadores. Toda ésta cantidad de calor se trasmite al medio y eleva la temperatura. Por lo tanto al trabajar con temperatura ambiente que varía entre 25 – 35°C, más la cantidad de calor generado no se requiere de un serpentín o de una camisa de vapor.

- **Agitadores.-** Está en función de su consistencia; El agitador recomendado es de tipo paleta. La velocidad de agitación debe ser de 60rpm.

FIGURA. 3.11. AGITADOR DE PALETA.

- **Capacidad del bioreactor.** Para calcular las dimensiones del bioreactor nos basamos en la siguiente ecuación:

Para conocer el diámetro de un bioreactor usamos la fórmula de:

FORMULA I. CÁLCULO DE VOLUMEN

$$V = \frac{\pi H D^2}{4}$$

Donde

H es la altura

V = volumen

D = diámetro

$\pi = 3.1416$

Si : H = D tenemos

$$V = \frac{\pi D^3}{4}$$

Despejando tenemos:

FORMULA II. CALCULO DEL DIAMETRO.

$$D = \sqrt[3]{\frac{4V}{\pi}}$$

Ejemplo:

Para un proceso piloto se trabaja con un máximo de 20 litros o 0.02 metros cúbicos Reemplazando tenemos:

$$(4(0.02)/3.1416)^{1/3} = 0.294\text{m o } 29.42 \text{ cm.}$$

Para calcular la altura reemplazamos el diámetro en la fórmula I y despejamos la altura.

$$\frac{V4}{\pi D^2} = H$$

Esto nos da $H = 0.2887\text{m o } 28.87 \text{ cm}$. Esta altura es de llenado del tanque

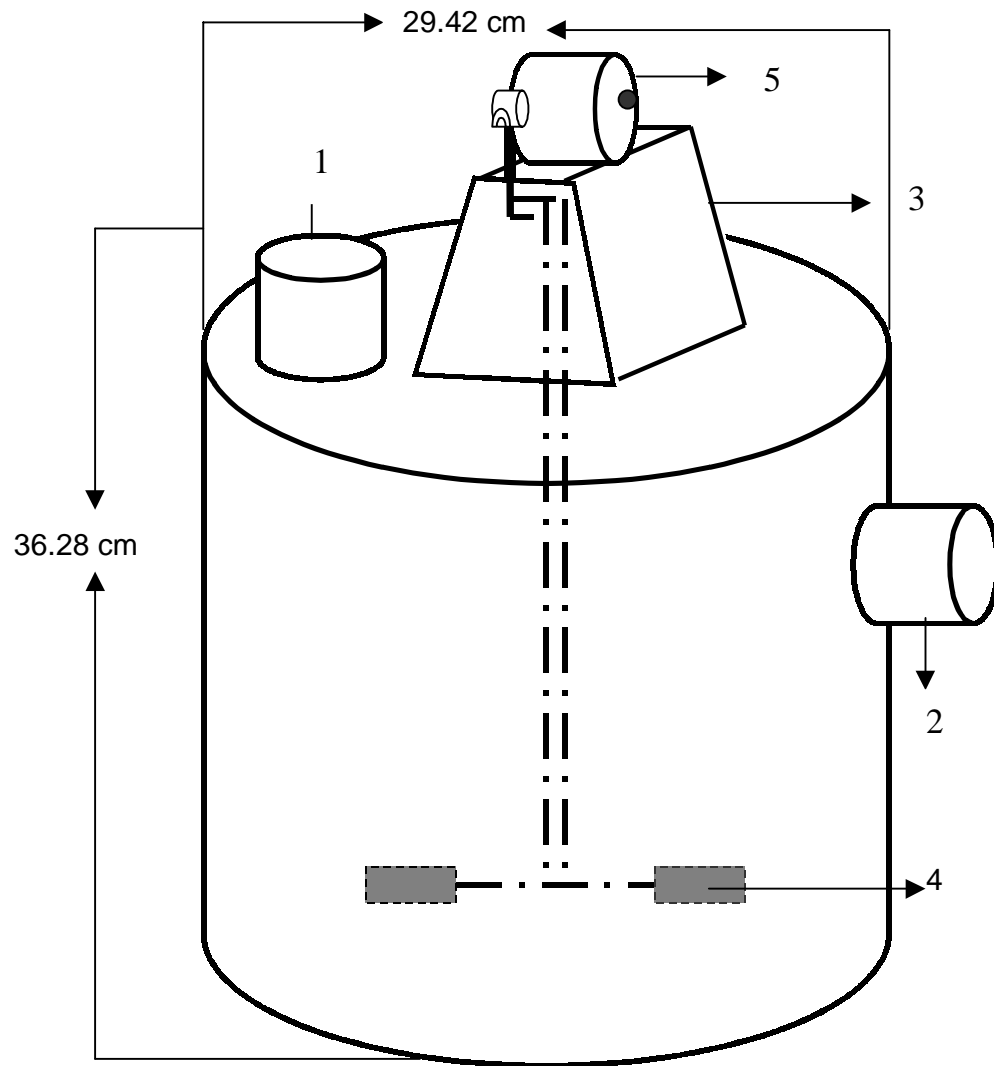
A este valor hay que sumarle el 25% del diámetro es decir $H = 0.25D$.

$$H = 0.25(29.42\text{cm}) = 7.36\text{cm}$$

La altura total será de $7.36 + 28.87 = 36.23\text{cm}$.

- **Material.-** El material del bioreactor tiene que ser sanitario, resistente al ácido, fácil de limpiar, el polipropileno cumple con éstas características.

FIGURA 3.12 BIOREACTOR TIPO TANQUE



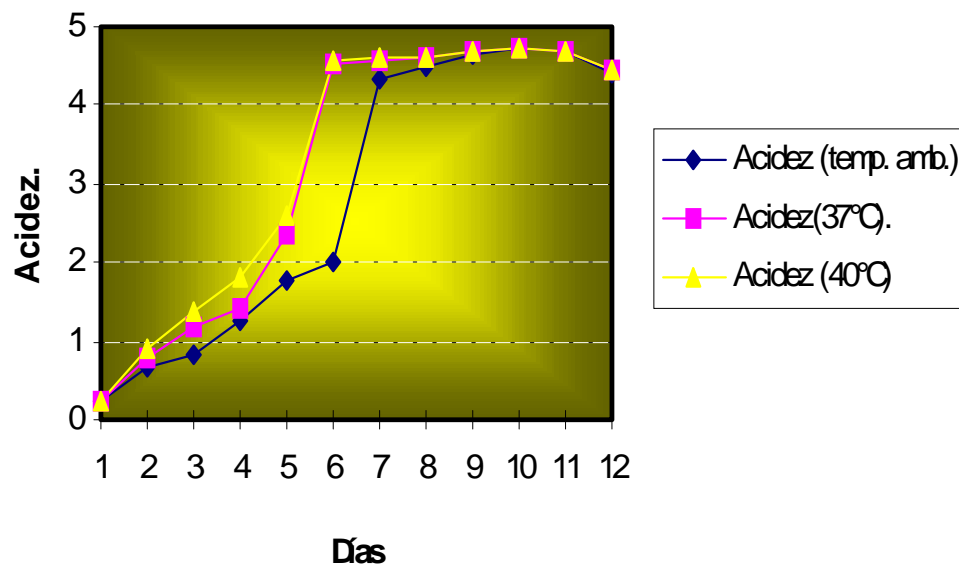
FUENTE: ELABORADO POR FERNANDA HURTADO Y EVEN BASURTO.

- | | |
|---|---------------------------|
| 1.- Entrada del bioreactor | 2.- Salida del bioreactor |
| 3.- Prensa estopas y
cojinetes del agitador. | 4.- Agitadores de paleta. |
| 5.- Motor. | |

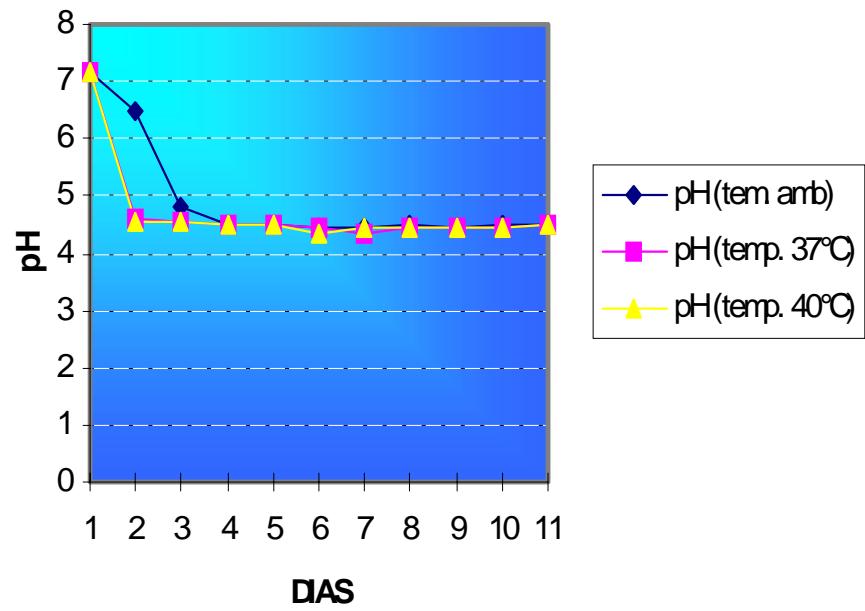
3.3 ANALISIS DE RESULTADOS.

- La Figura 3.12, muestra el efecto de la temperatura sobre la producción de ácido láctico, observamos que a 40°C hay mayor producción de acidez en los primeros 8 días, pero a medida que aumentan los días el porcentaje de acidez es casi igual a diferentes temperaturas.
- La Figura 3.13, muestra la influencia de la temperatura sobre el pH, y nos damos cuenta que el pH a 37 y 40°C tiene un descenso brusco de 7.5 a 4.5 durante los primeros dos días, esto tiene relación con la etapa de máxima crecimiento de las bacterias donde, a medida que consumen sustrato van produciendo ácido láctico, mientras que a temperatura ambiente el descenso es más lento durante los primeros días y luego llega a alcanzar un pH de 4.5.

FIGURA 3.12 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACIDEZ

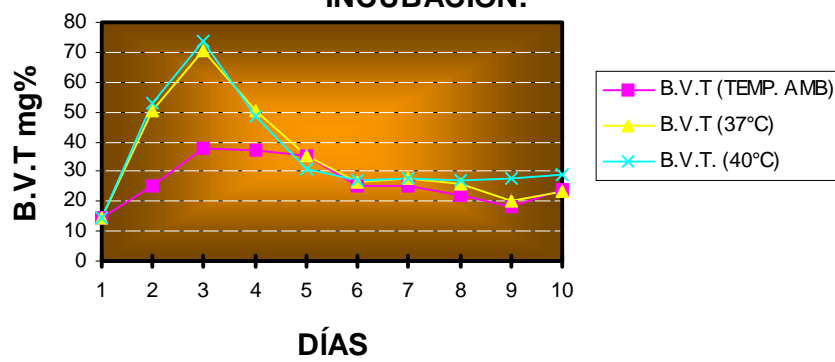


**FIGURA 3.13 EFECTO DE LA TEMPERATURA
SOBRE EL pH**



- En cuanto a las Bases Volátiles Totales, existe una relación con el crecimiento de microorganismos no deseables y las bacterias lácticas, produciéndose una competencia entre ellas, que se nutren del mismo sustrato; Los microorganismos no deseables decrecen paulatinamente con la producción de ácido láctico, que actúa como inhibidor de éstas (ver Figura 3.14)

**FIGURA 3.14 VARIACIÓN DE LAS B.V.T. A
DIFERENTES TEMPERATURAS DE
INCUBACIÓN.**

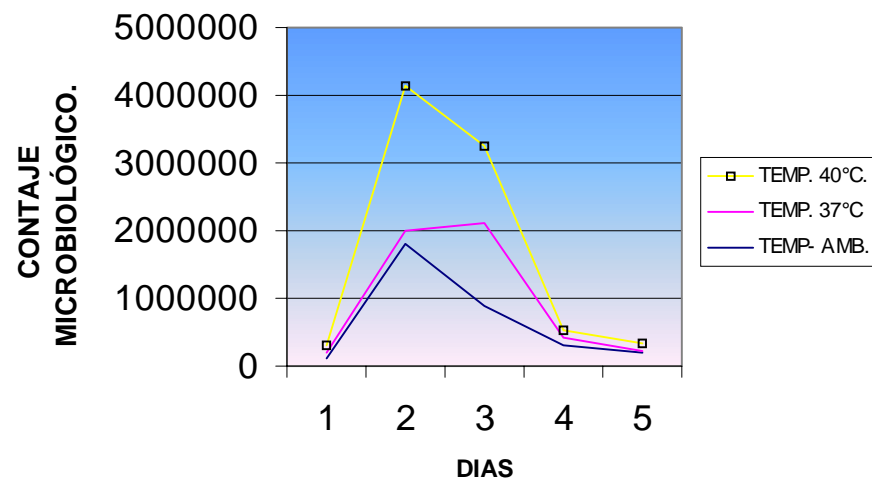


- La figura 3.15, muestra el desarrollo microbiano a diferentes temperaturas así, se observa que a 40°C, se produce el mayor incremento de bacterias, mientras que a temperatura ambiente se da el menor crecimiento bacteriano.

- El crecimiento bacteriano a 37°C se asemeja mucho al que se da temperatura ambiente, en las primeras 48 horas, pero a partir de las 72 observamos que a temperatura ambiente comienza a morir las bacterias (lisis), mientras a 37°C entra en un estado estacionario y luego decrecer hasta llegar a una etapa de estabilidad.

- Observamos también en esta figura una fase de muerte acelerada (descenso) que se da en las tres temperaturas tomadas como referencia, si comparamos estos con la acidez y el pH podemos decir que se debe a la producción de ácido láctico que actúa como inhibitorio del crecimiento bacteriano.

FIGURA 3.15 RECUENTO MICROBIOLÓGICO A DIFERENTES TEMPERATURAS.



- En la tabla XX, realizamos un estudio comparativo entre el producto obtenido y los requerimientos de los lechones después del destete, observando que la proteína, principal nutriente requerido se encuentra 2% por debajo de lo establecido, pero que puede variar dependiendo de las partes utilizadas para la elaboración del producto, sin embargo en el momento de la preparación de la dieta puede mejorarse con otro agregado proteico, es importante recalcar también que un elevado porcentaje de proteínas puede causar en el lechón problemas de desaminación en los riñones produciendo daños al animal (12)

TABLA XX ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE PRODUCTO OBTENIDO
Y LOS REQUERIMIENTOS DE LOS LECHONES.

Nutrientes	Producto obtenido (%)	Requerimientos del lechon(%)
Proteína	13.5 – 16%	18%
Grasa	2.0 – 3.00	2.5%
Calcio	0.46 – 0.5%	0.80%

- Estudios realizados por el Instituto Tecnológico del Perú por N. Areche T. , Z. Berens V y G. León O. obtuvieron a partir de pescado entero de bajo costo comercial un porcentaje de proteínas de 16.16%.
- Estudios realizados por G. Rodríguez V.; B. Fedor A; R. Contreras P. y R. Flores G., G. Navarro G. A. Ezquierra, L. Pérez C. en el Centro de Investigaciones Pesqueras de la Habana Cuba, obtuvieron a partir de

pescado de bajo costo comercial, un 12.12% de proteína, utilizando enzimas comerciales (10).

- E. Bertullo y Col, del Instituto de Investigaciones Pesqueras de la Facultad de veterinaria de la Universidad de la República de Uruguay, Montevideo, la proteína varió entre 9.05 y 10.05% de proteína bruta (10)

- En el Instituto Nacional de Pesquisas de Amazonía – INPA, Manaus (FAO –Dirección de Industria Pesqueras), se obtuvo un porcentaje de proteínas que varió del 11.30 – 13.26% también partiendo de pescado entero de bajo precio comercial (11)

CONCLUSIONES.

1. Los subproductos pesqueros, mezclados con los excedentes agrícolas son útiles para la alimentación animal.
2. El proceso se realiza en condiciones anaerobicas con bacterias *Streptococcus Thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*.
3. La temperatura ideal de crecimiento bacteriano es de 40°C. pero el proceso también se desarrolla a temperatura ambiental (26°C) y a temperaturas de 37°C.
4. La acidez del producto se lleva a cabo entre 4 .5 y 4.8% de ácido láctico y un pH de 4.5 y 4.8.
5. El tiempo de incubación debe ser de 48 horas.

6. Las Bases Volátiles Totales, es un indicativo de deterioro, no debe ser mayor a 30 miligramos por ciento.
7. El conteo microbiano se encuentra en un máximo de 10^6 bacterias por gramos (UFC/g). Libre de enteropatógenas (*salmonella*, *shiguella*, *coliformes*), *Estafilococos aureus* y hongos.
8. El producto tiene un porcentaje de proteínas entre 13 y 16%, la grasa está entre 2 y 3%; humedad entre 68 – 75% y cenizas entre 2,5 y 3.57%.
9. El bioreactor seleccionado es de tipo tanque, discontinuo, cerrado.
10. La agitación no debe exceder de 60rpm para evitar destrucción de la estructura de las bacterias.
11. Los agitadores deben ser de tipo paleta.

RECOMENDACIONES.

1. El proceso debe ser cuidadosamente controlado, en especial en las condiciones de higiene para evitar contaminación por microorganismos patógenos.
2. Es necesario que la materia prima, aunque sea producto de desecho se mantenga en buenas condiciones de preservación.
3. El producto debe ir destinado a la alimentación de los lechones después del destete, debido al porcentaje alto de proteínas, como complemento de la dieta diaria, en lo que significaría un costo menor en la alimentación de cerdos.

4. Es preferible trabajar con bacterias certificadas, para evitar interferencias de otras bacterias que puedan producir compuestos pútridos en el momento del desarrollo del producto.

5. Se recomienda llevar este producto a experimentación con animales (lechones) como complemento a este trabajo.

A P E N D I C E

APENDICE A

Bases Volátiles Totales. Método por destilación.

Son componentes nitrogenados que reaccionan con los ácidos produciendo sales químicamente estables que pueden ser destiladas recogidas y neutralizadas con ácidos. La cantidad de ácido combinado es una medida del contenido total de Bases Volátiles presentes. El resultado es comúnmente expresado en miligramos de nitrógeno por 100 gramos de muestra.

Este método se basa en la destilación, después de la precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético al 5% y posterior extracción con óxido de magnesio que es recogido en una solución de ácido bórico al 1% y posterior titulación con HCl 0.1N.

Método.

1. Mezclar 100 gramos de muestra con 300 ml de ácido tricloroacético al 5%.
2. Filtrar con papel filtro cualitativo.
3. Llevar a un balón de destilación de 800 ml de capacidad
4. Agregar 1 – 2 gramos de óxido de magnesio.
5. Adicionar 100 ml de agua destilada.
6. Agregar 1 – 2 de gotas de antiespumante y parafina.

7. Recoger el destilado en una fiola de 500ml de capacidad que contenga 25 ml de ácido bórico al 1% con gotas del indicador mezcla de verde de bromocresol y rojo de metilo.
8. Destilar por un lapso de 20 minutos a partir de ebullición.
9. Titular con HCl 0.1N hasta una coloración anaranjado pálido inicial.

Cálculos:

Consumo de HCl 0.1N x Normalidad del HCl 0.1 x 14 x100 = mg%

Peso de la muestra.

APENDICE B.

MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS DE ANALISIS MICROBIOLÓGICOS.

MÉTODOS ICMSF ¡Error! Marcador no definido.

CONTAJE EN PLACA (TOTAL DE VIABLES CONTABLES) T.V.C.

FUNDAMENTO

Básicamente el método consiste en la preparación de placas utilizando muestras diluidas y el agar PCA (Plate Count Agar) contando las colonias después de la incubación el tiempo de incubación dura de acuerdo a la temperatura de la misma.

MATERIALES Y APARATOS

- Cajas Petri de 90 mm de diámetro por 15 mm de alto.
- Tubos de ensayo de
- Fundas Plásticas de
- Stomacher
- Incubadora
- Autoclave
- Balanza

- Bandejas y/o platos de Aluminio (Acero).
- Tijeras
- Pinzas
- Pipetas
- Contador de Quebec

REACTIVOS

- Agua destilada
- Agua de Peptona
- Plate Count Agar (PCA)
- Alcohol
- Cloruro Trifenil Tetrazolio

AGUA DE DILUCIÓN.

Está formada por agua de Peptona al 0.1 %, se autoclava a 115 °C y a 15 lbs de presión por 15 minutos.

AGUA COUNT AGAR (PCA).

Se prepara según las indicaciones de la etiqueta; pero cuando ya empieza a hervir se le adiciona 3 ml/lit de trifenil tetrazolio, esto sirve para que las colonias

se tiñan y pueden contarlas, luego se autoclava a 115 °C, y 15 lbs. de presión por 15 minutos.

TÉCNICA

- 1.- Se homogeniza bien la muestra y se pesan 30 gramos.
- 2.- Se coloca en una funda plástica y se adicionan 270 ml de agua de dilución (agua de peptona) se homogeniza (en la stomacher por 2 minutos), así tendremos la muestra lista y la dilución será 10^{-1} .
- 3.- Se toman 4 ml y se coloca 1 ml en una caja petri y otro ml en otra caja petri, y los otros 2 se coloca en un tubo de que contiene 18 ml de agua de dilución se homogeniza bien el tubo y obtendremos así la dilución 10^{-2} .
- 4.- Tomamos otra vez 4 ml y de igual manera se coloca 1 ml en 2 cajas petri y los otros dos en otro tubo de ensayo que contiene agua de dilución (18 ml), se homogeniza bien y obtendremos dilución 10^{-3} se sigue con el mismo procedimiento hasta llegar a la dilución 10^{-5} .
- 5.- Cuando tengamos las 10 cajas petri con 1 ml de muestra cada una colocamos el Agar PCA, por vaciado se añaden más o menos 18 o 20

ml, este agar ha sido previamente diluido en Baño de María y se lo deja enfriar hasta más o menos unos 45°C (cuando la mano soporta), se adiciona el agar caja por caja y se homogeniza con 5 vueltas hacia la izquierda y 5 hacia la derecha; se deja solidificar, luego se guardan las cajas en la incubadora a 37°C por 72 horas.

El tiempo de incubación puede ser:

72 horas a 25°C A menor temperatura mayor tiempo.

48 horas a 37°C A mayor temperatura menor tiempo.

- 6.- Luego de la incubación se realiza el contaje en el contador de Quebec. Las colonias que se observan son rojas, esto es porque al PCA se le agrega 3 ml por litro de una solución acuosa de Cloruro Trifenil Tetrazolio que es un colorante; y este colorante es absorbido por las bacterias y se fija en el DNA y RNA de los mismos, las colonias que no son rojas no se las cuenta por que no son bacterias sino que pueden ser hongos o levaduras.

Se debe contar entre 30 a 300 colonias, cuando son mucho más de 300 se reporta TNTC (demasiado alto para contar).El error que puede existir entre un contador y otro está entre el 4 y el 6%.

El resultado se obtiene según la siguiente fórmula:

$$\text{STVC a } 25^{\circ} \text{ C} = \frac{\mathbf{a_1x + a_2x + a_1y + a_1z}}{\mathbf{2,22}}$$

El resultado se expresa con el exponente de la dilución en que se empieza a contar.

APENDICE C.

DETERMINACIÓN DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA POSITIVA

FUNDAMENTO

Se basa en la determinación de estafilococos usando el medio Baird Parker.

Este medio contiene litio, cloruro y telurito para la inhibición de la flora acompañante, y el piruvato y la glicocola actúan favoreciendo selectivamente el crecimiento de estafilococos y permite observar 2 características diagnósticas:

- Por lipólisis y proteólisis se producen halos y anillos característicos y
- Debido a la reducción del telurito se desarrolla una coloración negra.

MATERIALES Y APARATOS

- Fundas
- Tijeras
- Bandejas
- Autoclave
- Balanza
- Stomacher
- Cajas petri

- Incubadora

MEDIO

- Agua de dilución (agua de peptona al 0,1%)

- Agar Baird Parker + emulsión de yema de huevo estéril + Telurito de Potasio.

TÉCNICA

- 1.- Pesar 30g. de muestra + 270ml de agua de peptona al 0,1% realizar los diluciones decimales (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}).

- 2.- Distribuir 18ml de agar Bair Parker con emulsión de yema de huevo estéril (50ml de emulsión por cada 1000 ml de agar) + Telurito de Potasio al 10% (3ml por cada 1000 ml de agar) en varias cajas petri, cuando ya se haya solidificado el agar transferir 0,5ml de las muestras (diluciones decimales) en el centro del medio de cultivo para extenderlos con un asa de Drigolsky estéril. Luego que el inculo se haya absorbido incubar las cajas a 37°C por 24 a 48 horas y observar colonias típicos negros de 1 a 5m de diámetro con bordes estrechos blanquecinos rodeados por un halo claro; y hacer la prueba de la coagulosa.

A PENDICE D.

DETERMINACIÓN DE *SALMONELLA*

FUNDAMENTO

Consiste en un pre-enriquecimiento usando como medio agua de peptona buferada, para incrementar la recuperación de especies de *Salmonellas* deterioradas por técnicas de elaboración, preservación, preservantes, presión osmótica alta, cambios bruscos de pH, etc. produciendo una reparación de las células deterioradas.

Luego el enriquecimiento usando caldo tetrathionato medio que inhibe la proliferación de grupos *Coliformes* (m.o. fecales) y permiten que los tifoïdes (*Salmonellas* que reducen el tetrathionato) aumenten sin restricción.

Después viene el aislamiento usando agar Xilosa Lisina Desoxicolato XLD, en el que el desoxicolato produce la inhibición de las bacterias coliformes y la dispersión de cepas de *Proteus* la diferenciación entre *Shiguellas* y *Salmonellas* ocurre por 3 reacciones:

- Fermentación de la XILOSA.
- Descarboxilación de la Lisina.

- Producción de gas sulfhídrico.

MATERIALES Y APARATOS

- Fundas
- Bandejas
- Balanzas
- Stomacher
- Autoclave
- Incubadora
- Cajas petri

MEDIOS

- Agua de peptona Buferada BPW
- Caldo Tetrahionato
- Agar XLD.

TÉCNICA

- 1.- Pesar 25 g. de muestra + 225 ml. de BPW, homogenizar en el estomacher por dos minutos, incubar a 25°C por 6 horas, luego a 37°C. hasta completar las 24 horas.

- 2.- Se transfiere 1 ml. de este cultivo a un tubo de ensayo que contiene 10 ml. de caldo tetrathionato, incubar en Baño de María a 44°C por 24 horas.
- 3.- Sembrar por agotamiento una azada de éste cultivo en agar XLD incubar a 37 °C por 24 horas.
- 4.- Observar colonias características que son rojas con centros negros, y se puede entonces realizar las pruebas bioquímicas.

APENDICE E.

DETERMINACIÓN DE *SHIGUELLA*.

FUNDAMENTO

La determinación de *Shiguelia* se basa en un pre-enriquecimiento usando agua de peptona buferada (BPX), que le proporciona condiciones adecuadas para la reparación de las células que se hayan lesionado durante el proceso de preparación y preservación de los alimentos.

Para la fase de enriquecimiento utiliza caldo Gram Negativo (GN) o caldo Gram Negativo de Hajna, que favorece la recuperación de los organismos Gram negativos, especialmente *Shiguellas* y *Salmonellas*, pues en su composición tiene triptona que actúa como nutriente en el medio, el citrato de sodio y el desoxicolato de sodio son bactericidas para organismos Gram positivos e inhiben el desarrollo de coliformes, mientras que los fosfatos sirven de buffer. La incrementada concentración de manitol sobre la dextrosa ayuda a limitar el crecimiento de *Proteus* y aceleran el de *Shiguelia*.

El aislamiento de *Shiguelia* se lo hace usando agar Entérico de Hektoen (HEA) que es un medio diferencial selectivo para el aislamiento de especies de *Shiguelia*, este medio permite el crecimiento de *Shiguelia spp.* muy fácilmente

debido al elevado contenido de carbohidratos, peptona y por la menor toxicidad del sistema indicador.

MATERIALES Y APARATOS

- Fundas
- Bandejas
- Stomacher
- Balanza
- Autoclave
- Incubadora
- Cajas petri

MEDIOS

- Agua de peptona buferada (BPW)
- Caldo de Hajna 9GN
- Agar Entérico de Hektoen (HEA)

TÉCNICA

- 1.- Pesar 25 g. de muestra + 225 ml. de BPW.
- 2.- Homogenizar en el estomacher por 2 minutos.
- 3.- Incubar a 25°C. por 6 horas, luego a 37°C. hasta completar las 24 horas.
- 4.- Se transfiere 1 ml. de este cultivo a un tubo de ensayo que contiene 10 ml. de caldo GN esterilizado.

- 5.- Se incuba a 37°C por 24 horas.
- 6.- Para el aislamiento se siembra por agotamiento una azada de éste cultivo en agar HEA, se incuba a 37°C. por 24 horas. Se observan colonias características que son verdes elevadas húmedas, se inocula en los medios correspondientes para realizar las pruebas bioquímicas.

APENDICE F.

DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES Y *ESCHERICHIA COLI*.

FUNDAMENTO

El método del número más probable en el crecimiento (turbidez) y producción de gas a partir de inoculos pequeños de organismos coliformes en caldo lauril sulfato (LSB), que por su elevada calidad nutritiva y el tampón de fosfatos que contiene garantiza el rápido crecimiento y la intensa producción de gas incluso en casos de coliformes que presentan lentamente a la lactosa, la producción de gas se observa en los tubos Durham.

Para la determinación de los *Coliformes Fecales* se usa el caldo bilis verde brillante (BBGB) que es capaz de inhibir microorganismos distintos del grupo *Coliforme*, por el contenido reducido de Bilis y la dilución de mayor colorante mejorarán la condición de desarrollo de los Coliformes fecales y de la *E. Coli*.

La fermentación de la lactosa y la producción de gas es un indicativo de la *Escherichia coli* que se verifica en los tubos Durham; los restantes coliformes crecen pero sin producir gas.

Para el aislamiento de la *Escherichia Coli* se usa el agar Eosina Azúl de metileno (EMB) que proporciona una excelente diferenciación entre *E. Coli* y *Enterobacter aerógenes*.

MATERIALES Y APARATOS

- Tubos de ensayo
- Fundas
- Cajas Petri
- Stomacher
- Incubadora
- Autoclave
- Tijeras
- Bandejas
- Pipetas
- Balanza

REACTIVOS Y/O MEDIOS

- Agua de dilución (Agua de peptona al 0,1%)
- Caldo Lauril Sulfato (esterilizada a 121°C, 15 atmósferas por 15 minutos)
- Caldo Bilis verde Brillante (esterilizado a 121°C, 15 atmósferas X 15 minutos)

- Agua de Triptona

TÉCNICA

- 1.- Se debe diluir la muestra a una concentración definida a partir de la cual se hacen las diluciones decimales (10^{-3}).
- 2.- Se transfiere 1ml de cada dilución (3 series de cada dilución decimal sucesiva), en total a 9 tubos con 10ml LSB, estos se incuban a 37°C por 48 horas. Si se reconoce turbidez, y producción de gas en la campanilla de Durham, esto será positivo para *Coliformes Totales*.
- 3.- De los tubos que dieron positivo en el LSB se toma una asada y se siembra en agua de triptona y BBGB por pareja.
- 4.- Se incuba a 44°C en Baño de María por 24 horas, de igual manera se observa la presencia de turbidez y gas en la campana de Durham, entonces esto será positivo para *Coliformes Fecales*.
- 5.- En el tubo de agua de triptona que también tiene el inóculo se realiza la prueba de indol colocándole el reactivo de Kovacs, una reacción positiva se demuestra por la formación de un anillo púrpura en la superficie por la presencia de triptófano.

6.- Para determinar *Escherichia Coli* se siembra por agotamiento en agar EMB una asada del cultivo del BBGB que dió positivo la prueba del indol. Se incuba a 37°C por 24 horas. Se observan las colonias características pequeñas, que son tornasoladas y se hace tinción de Gram; y para confirmar la pruebas bioquímicas del IMVIC que corresponden a:

- Indol
- Rojo de metilo
- Voger Proskauer Acetoina
- Citrato

Se calcula el número más probable (NMP) de *Coliformes Totales* y *Fecales* por 100g. de nuestra ó 100ml de muestra utilizando la tabla correspondiente a través de los tubos positivos en cada etapa del examen.

Prueba rápida para la detección de *Escherichia Coli*

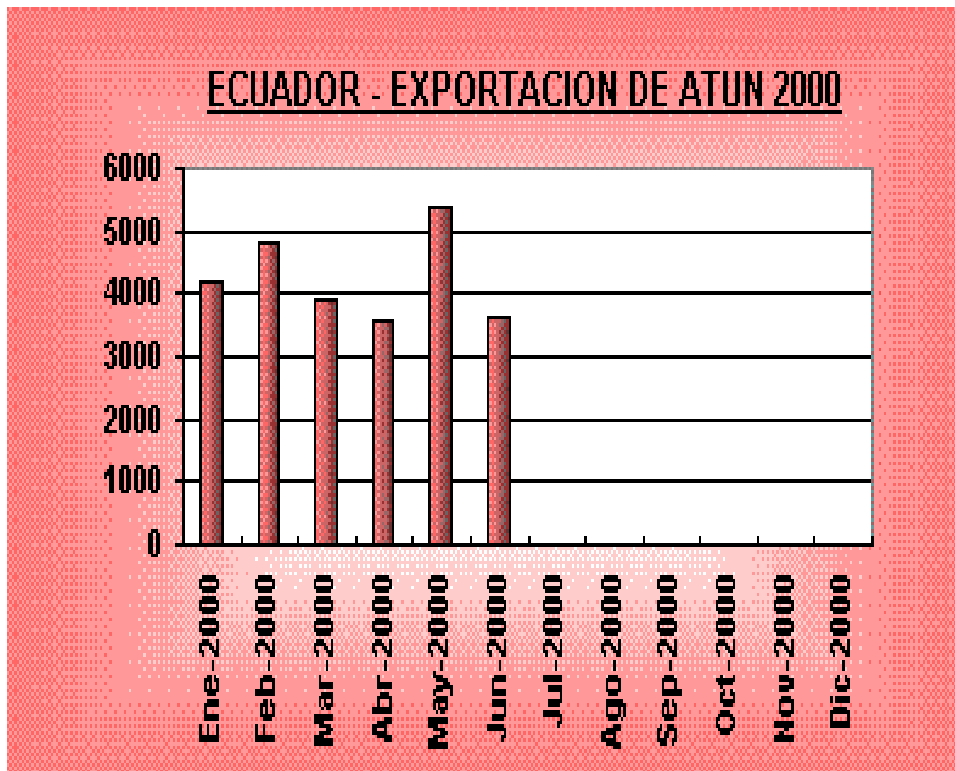
1.- A 3 tubos con 10ml de medio de caldo *E. coli* (*Escherichia Coli*) se añade 1ml de la dilución menor (10^{-1}) de la muestra, se agita y se incuba a 44,5°C por 24h en un baño de María.

- 2.- La prueba es positiva cuando hay burbuja de gas en la campana de Durhan.

- 3.- La prueba se continua con la siembra de tubos E.C positivos en agar EMB donde se observa el desarrollo de colonias pequeñas con brillo verde ó tornasolado y se completa el examen con la prueba del IMVIC arriba mencionando.

APENDICE G.

TABLA. XXI. EXPORTACIONES DE ATUN DE ENERO A JUNIO DEL 2000



Fuente: Cámara de Acuicultura.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Areche N., Berenz Z., León G. Utilización del ensilado de residuos de pescado en dietas para cerdos. Boletín científico. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú. Vol. 4 1994.
2. Braverman J.B.S. Bioquímica de los alimentos. Segunda Edición. Edición el Manual Moderno.
3. Burgess G.H.O; Cutting C.L.; Lovern J.A. y Watetman J.J. El pescado y las industrias derivadas de la pesca. Editorial Acribia. Zaragoza España. Pag 262 – 263.
4. Comisión Asesora Ambiental de la Presidencia de la República. Desarrollo y problemática ambiental del área del Golfo de Guayaquil. Enero 1996.
5. Escuela Nacional de Pesca. VII Seminario Internacional sobre temas Pesqueros. Argentina 1997.

6. Fisher H.J.; Hart F.L. Análisis Moderno de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza España . Pág 261,249.
7. Guy Carvaño C. Roda Edhar H. Ayala M.E., Gallo Miguel. Tecnología de alimentos pesqueros 4. Odepesca. Microbiología de productos pesqueros, Normas de Calidad.
8. Hoop V. Fundamentos de Tecnología Química. Editorial Reverte. Pág 319 – 326.
9. Informe de la FAO de Pesca. Segunda Consulta de Expertos sobre tecnología de productos pesqueros en America Latina.Montevideo. Uruguay. Pág 85, 88, 107, 115,.1989.
10. Kirck Enciclopedia Química. Tomo IX. Pág 228 – 229
11. Larrañaga J. Idelfonso; Carballo M. Julio; Rodríguez Ma del Mar; Fernández José a. Control e Higiene de los alimentos. Editorial Mc Graw Hill pág 32, 3398 – 136.
12. Montañó.Ramón Msc. Voletin Científico del Instituto Nacional de Pesca. 1976.

13. Revista de la Cámara Nacional de Acuicultura. Edición 22. Pág 22 – 24 1999.
14. Perry Robert H. Green Don W. Maloney James O. Manual del Ingeniero químico. Sexta Edición. Tomo II. Editorial Mc Graw Hill. Pág 27 – 31.
15. Peraza Hidalgo José R. Dr. Manual de higiene de los alimentos I y II. Ediciones enspes. La Habana. 1983.
16. Portela Mara Luz. Vitaminas y minerales en nutrición. Editores Lopez. Pág 83.
17. Owen P Ward.. Biotecnología. Manual de microbiología industrial. Editorial Acribia.
18. Veisseyre Roger PhD. Lactología Técnica. Segunda edición. Editorial Acribia. Pág. 228,51, 453.
19. Westhoff D.C.; Frazier W.C. Microbiología de los alimentos. Tercera Edición. Editorial Acribia S.A. Pág. 50 - 60.
20. Wolf Enveger. Annaliese Crieger Biología de los microorganismos de uso industrial. Pág 1, 4152 – 59; 67 – 68..

