

Estudio sobre la elaboración de ensilado microbiano a partir de pescado eviscerado

Rafael Bello¹, Elizabeth Cardillo² y Raúl Martínez¹

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos - Facultad de Ciencias - Universidad Central de Venezuela

RESUMEN. Se elaboró un ensilado microbiano a partir de una mezcla de pescados de diferentes especies, provenientes de la fauna de acompañamiento del camarón. Estos fueron mezclados con una fuente de carbohidratos (melaza), frutas (piña-lechosa), sorbato y un cultivo «starter» de la especie *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, y la mezcla fue almacenada a una temperatura de 35 °C.

En ensilado se evaluó a través de determinaciones de pH, acidez total titulable, consistencia, líquido exudado, nitrógeno no proteico y bases volátiles totales. También se realizaron estudios microbiológicos y de algunos metales tóxicos. Los resultados obtenidos indicaron una disminución del pH e incremento de la acidez a medida que transcurre el tiempo, obteniéndose un pH de 4,3 en los primeros 2 días, alcanzándose niveles más o menos constantes durante los 64 días de almacenamiento. En relación a la consistencia, nitrógeno no proteico y líquido exudado, se muestra una rápida licuefacción del producto a los 8 días de almacenamiento, para posteriormente tender a estabilizarse. Las bases volátiles totales aumentan durante los 64 días de almacenamiento.

En cuanto al aspecto microbiológico se pudo observar un alto recuento de aerobios mesófilos, psicrófilos, pseudomonas, al igual que la presencia de coliformes y *S. aureus* en la materia prima, sin embargo, en el ensilado líquido sólo se observa aerobios mesófilos, mientras que los microorganismos patógenos fueron restringidos, debido fundamentalmente al bajo pH del producto y a la presencia de ciertas sustancias antibacterianas producidas por las bacterias ácido-lácticas. La deshidratación del producto redujo aún más las posibilidades de desarrollo microbiano, encontrándose sólo esporas del género *Bacillus*, aunque la deshidratación por liofilización resultó ser menos drástica en la reducción del recuento microbiano. El análisis sobre algunos metales tóxicos mostró presencia del mercurio, plomo

y cromo, aunque por debajo de los niveles permitidos. La caracterización de la materia prima y el ensilado de pescado no presentaron mayores cambios en los valores de humedad, cenizas, grasas y proteínas; por tanto el proceso de fermentación y licuefacción no afecta la composición proximal del producto. Con respecto a la deshidratación, si se notan cambios, fundamentalmente en el porcentaje de grasa.

SUMMARY. Microbial fish silage production from several fish species. Microbial fish silage was produced from a mixture of several fish species that belong to the shrimp by-catch. They were mixed with molasses, fruits (pineapple and papaya), sorbate and a starter of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Process was evaluated by pH, acidity, consistency, exudate liquid, non-protein nitrogen, total volatile bases, microbial and toxicological tests. Results indicated that acid production and pH reduction occurs during the first two days of processing, later these values were maintained stable during 64 storage days. Total volatile bases increased during storage period. Consistency, non-protein nitrogen and exudate liquid showed that hydrolysis and liquefaction occurs during the first 8 days of processing. Raw material showed high counts of aerobic mesophilic and psychrotrophic organisms, in addition to *Pseudomonas*, coliform and *S. aureus*. However silage showed only a few aerobic mesophilic organisms due to low pH values and development of lactic acid bacteria. Silage dehydration reduces possibilities of microbial growth, and only spores of *Bacillus* were observed. Low levels of lead, mercury and chrome were detected in the dry silage. Proximal analysis values did not change during process and storage period.

¹ Profesor Investigador
² Investigador Asistente

INTRODUCCION

La obtención de proteínas de bajo costo, hoy día se plantea como una problemática a nivel de producción de alimentos de buena calidad con el fin de suplir las deficiencias existentes a nivel mundial. Una de las posibles vías que ha venido siendo objeto de estudio es la elaboración de concentrados proteínicos solubles, altamente nutritivos, utilizando pescado como materia prima (1). El valor nutritivo de la proteína proveniente de diferentes tipos de pescado es aproximadamente igual a la proteína de la leche. Las proteínas del pescado no sólo están balanceadas en la mayoría de los aminoácidos esenciales, además son generalmente ricas en lisina, que es deficiente en la mayoría de los cereales; sin embargo este recurso es sub-utilizado, aunado al hecho de la escasa vida útil que tiene el pescado luego de su muerte; de allí que el hombre ha intentado prolongar su vida útil utilizando las más diversas tecnologías (2).

Una de estas técnicas la constituye el ensilado de pescado, producto de fácil elaboración basado en la acidificación del medio, a modo de favorecer la proteólisis del pescado, lo que puede lograrse tanto químicamente por acidificación, o por la incorporación del cultivo láctico homofermentador de un sustrato rico en azúcares fermentables (3).

La conservación del pescado o sus desechos por medio del ensilaje, se ha producido sobre todo en comunidades de escasos recursos o con una relativa abundancia de productos de la pesca (4).

Es así como en Venezuela, dadas las condiciones costeras, aunado a los desperdicios por concepto de pesca de arrastre, así como también a los desperdicios de las plantas procesadoras de pescado, hacen que nuestra región represente una alternativa potencial para la introducción del ensilado como una nueva posibilidad para un eficiente utilización del pescado como provisión de fuente proteica tanto para la alimentación animal como para el consumo humano.

MATERIALES Y METODOS

Materiales:

- a. **Materia prima:** Se emplearon especies sub-utilizadas como *Micropogon furnieri* (roncador), *Trachurus lathami* (cataco), *Sardinella anchovia* (sardina) y *Merluccius albidus* (merluza); obtenidas en el Mercado Mayor de pescado de Coche-Caracas en estado de frescura
- b. **Fuente de carbono:** Melaza (85-90° Brix).
- c. **Microorganismo:** *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014.
- d. **Frutas:** Cortezas de *Carica papaya* (lechosa) y la totalidad de *Ananás comosus* (piña).

Métodos

1. Métodos físico-químicos:

Se determinó el contenido de humedad, cenizas, proteína,

grasa cruda y acidez titulable, según AOAC (5); pH, usando un equipo marca «Corning», nitrógeno no proteico según Stansby y col (6) y la digestión y destilación del nitrógeno según AOAC (5); consistencia, mediante el uso del consistómetro de Bosjtwick; líquido exudado, tomando 20 g de muestra, centrifugados a 7000 rpm por 10 minutos a 2 °C y el nitrógeno básico volátil total (NBVT) según el método de microdifusión de Conway (7).

2. Métodos microbiológicos:

- Enumeración de Aerobios mesófilos, según el método de siembra en placa por profundidad, utilizando Plate Count Agar (PCA).

Las placas se incubaron a 35 °C por 48 horas (8).

- Enumeración de mohos y levaduras, en Agar Potato Dextrosa (PDA) acidificado con ácido tartárico, incubando a 25 °C por 5 días (8).

- Enumeración de Coliformes totales, según la Técnica del Número Más Probable utilizando Caldo Lauryl Sulfato Triptosa e incubando a 35 °C por 48 horas (8).

- Enumeración de Coliformes fecales, según la técnica del Número Más Probable utilizando Caldo *Escherichia coli*, e incubación a 44,5 °C por 48 horas y posterior confirmación de *E. coli* mediante tinción de Gram y las pruebas IMVIC (8).

- Enumeración de *Staphylococcus aureus*, en Agar Baird Parker, e incubación a 35 °C por 48 horas (8).

- Detección de *Salmonella* sp: se realizó un preenriquecimiento en Caldo Lactosado y por último aislamiento en Agar SS y Bismuto (8).

- Enumeración de *Clostridium perfringens*, en Agar Triptosa-Sulfito-Cicloserina (TSC) e incubación en jarra de anaerobiosis a 35 °C por 24 horas (9).

- Enumeración de Enterobacterias, en Agar Glucosa Bilis Rojo violeta (BRV), incubando a 35-37 °C por 24 horas. Las colonias son de color rojo púrpura (8).

- Enumeración de Pseudomonas, por siembra en superficie en Agar Pseudomonas F y Pseudomonas P (8). Las placas fueron incubadas a 37 °C por 1 semana.

- Enumeración de Psicrófilos, según el método de siembra en placa en Agar Plate Count (PCA) e incubación a 4 °C por 3-5 días (8).

- Enumeración de Esporas de Aerobios y Anaerobios, por siembra en Agar Plate Count (PCA) e incubación

en condiciones aeróbicas y aneróbicas respectivamente a una temperatura de 35 °C por 24 horas (8).

3. Metales tóxicos:

Se realizaron determinaciones de cromo, plomo y mercurio en el ensilado líquido de pescado mediante la técnica de espectrofotometría de absorción atómica.

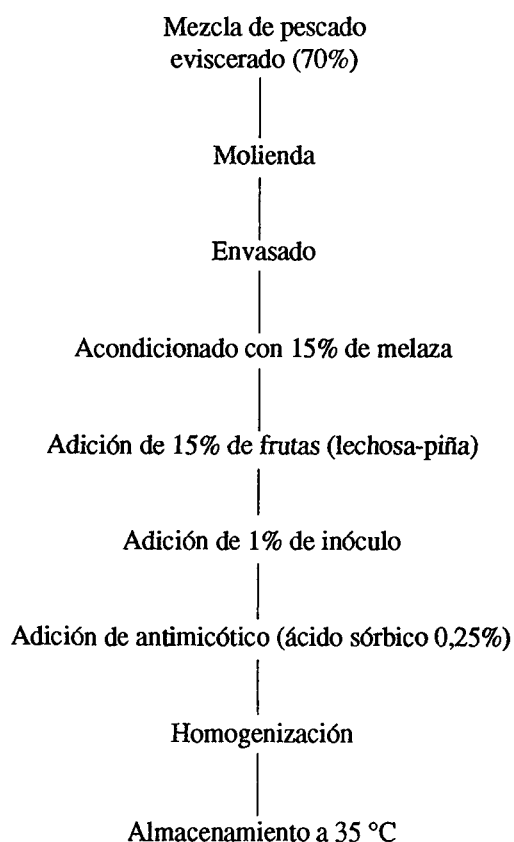
Procesamiento:

El pescado, una vez lavado, fue eviscerado y cortado en trozos y se procedió a la elaboración del ensilado vía microbiana de acuerdo al esquema tecnológico mostrado en la Figura 1.

El producto fue colocado en un recipiente con una capacidad de 30 Kg, se agitó y se almacenó a temperatura de 35 °C. Posteriormente fue deshidratado mediante tambor y por liofilización, determinando su composición proximal y el recuento microbiológico.

FIGURA 1

Esquema tecnológico para la elaboración de ensilado de pescado por vía microbiana



RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se muestran las variaciones de pH tanto de la materia prima como del ensilado de pescado durante el almacenamiento. Se puede observar que la materia prima presenta valores de pH muy parecidos al ensilado de pescado para el tiempo cero; sin embargo en el ensilado se nota una progresiva disminución de este parámetro a medida que transcurre el tiempo.

En los primeros 2 días ocurrió una marcada caída del pH a 4,3, alcanzándose niveles más o menos constantes durante los 64 días de almacenamiento.

El pH es uno de los índices de mayor importancia que debe controlarse durante el proceso de elaboración del ensilado, ya que los cambios en el mismo son indicativos de la calidad del producto. Según Van Wik y Heydenrich (10), para obtener un ensilado estable, éste debe alcanzar un pH menor o igual a 4, ya que bajo estas condiciones se frena el crecimiento y la actividad de ciertos microorganismos que puedan conducir a la descomposición del producto.

En relación a los cambios producidos en los valores de acidez, se muestra un incremento en la producción de ácido láctico en el producto a medida que transcurre el tiempo hasta alcanzar niveles estables (Tabla 1).

TABLA 1
VALORES DE PH Y ACIDEZ DURANTE EL
ALMACENAMIENTO
DEL ENSILADO DE PESCADO

Tiempo (días)	pH	Acidez (% de ácido láctico)
0 (Materia prima)*	5.67	0.83
0 (Ensilado)	5.62	0.92
1	4.39	3.53
2	4.27	5.02
8	4.17	6.82
15	4.22	6.87
32	4.21	6.72
64	4.28	6.89

*: La materia prima está constituida por la mezcla de pescado, melaza, frutas, sin inóculo. El ensilado si contiene inóculo.

El hecho de que el pH y la acidez se mantengan constantes a partir de los 8 días de almacenamiento es debido fundamentalmente al cese del proceso fermentativo, consecuencia esto, de que los microorganismos tienden a disminuir ligeramente en número, debido a la concentración de ácido presente en el medio, el cual actúa inhibiendo la cepa y a la disminución de la fuente de carbono incorporada inicialmente al medio.

Con respecto al nitrógeno no proteico, en la Tabla 2, se puede observar un rápido incremento de la hidrólisis en los 8

días de almacenamiento, la proporción de nitrógeno, soluble en relación al nitrógeno total fue de 74,15%, para posteriormente tender a estabilizarse.

TABLA 2
VALORES DE NITROGENO NO PROTEICO,
LIQUIDO EXUDADO, CONSISTENCIA Y BASES
VOLATILES TOTALES DURANTE EL
ALMACENAMIENTO DEL ENSILADO DE PESCADO

Tiempo (días)	Nitrógeno no proteico (% N-Total)	Líqu. exudado (ml/20g)	Consistencia (cm/30 seg)	NBVT (mg/100g)
0 (MP)*	15.27	0.00	0.50	28.96
0 (E)	28.70	0.00	1.00	28.96
1	52.53	2.33	3.00	28.72
8	74.15	7.92	20.00	37.92
15	71.64	6.15	>24.00	43.42
32	68.37	8.26	>24.00	51.15
64	69.30	10.39	>24.00	50.71

*: La materia materia prima está constituida por la mezcla pescado, melaza, frutas, sin inóculo. El ensilado si contiene inóculo.

E: Ensilado de Pescado

Según estos resultados se puede notar que existe una fracción resistente a la hidrólisis. La razón de la presencia de esta fracción resistente no está claro y puede estar relacionado con el pH, temperatura, duración del ensilaje y naturaleza de la materia prima.

Raa y Gildberg (11) sugieren que los enlaces sulfuros puedan dar resistencia estructural al ataque enzimático. Las fracciones no digeridas también permanecen cuando los tejidos de pescado son solubilizados por enzimas comerciales.

Igualmente se puede observar una relación entre el pH y el nitrógeno no proteico, ya que a medida que disminuye el pH y la temperatura de almacenamiento se mantiene sobre la temperatura ambiente se favorece la actividad proteolítica de ciertas enzimas (pepsina, tripsina), las cuales actúan sobre las proteínas del tejido muscular del pescado produciendo la consiguiente hidrólisis proteica ($r = -0,947$) con un nivel de significancia de 5%.

También es importante destacar que existen diferencias en los valores de nitrógeno no proteico de la materia prima y el ensilado de pescado a tiempo cero (el contenido de NNP de la materia prima es menor que para el ensilado de pescado), lo cual puede ser debido a la materia nitrogenada presente en la suspensión que contiene el inóculo (caldo MRS) que se adiciona al ensilado de pesado.

Durante el almacenamiento del ensilado de pescado tanto químico como microbiano se observa una rápida licuefacción del mismo (12). Esto se evidencia con las determinaciones de consistencia y líquido exudado obtenidas. Ambos parámetros al igual que la determinación del nitrógeno no proteico son utilizados para evaluar el grado de licuefacción del producto.

Respecto a los valores de líquido exudado, se observa un comportamiento similar al obtenido para el nitrógeno no proteico, consecuencia esto, del proceso de hidrólisis que se está desarrollando en el producto. Se puede notar que este aumento es bajo al primer día, aumenta rápidamente a los 8 días y luego incrementa poco a poco (Tabla 2).

En relación a la consistencia, se observa un aumento en los cm. recorridos por el producto en 30 seg. a medida que transcurre el tiempo. Esto es indicativo que en el almacenamiento a medida que incrementa el volumen de líquido exudado por los tejidos de pescado hay una disminución en el grado de consistencia del ensilado, lo cual se traduce en un mayor espacio recorrido en un tiempo dado.

Esto se explica igualmente por el proceso de hidrólisis que se está dando en el producto, observándose que en los primeros 8 días hay cambios marcados en los valores de consistencia, hasta volverse líquido (Tabla 2).

La materia prima presentó valores de consistencia y líquido exudado iguales al ensilado para el tiempo cero.

Como resultado de la actividad bacteriana y reacciones de autólisis, se forman compuestos que son ampliamente utilizados en la determinación de la frescura del pescado, por ejemplo, las bases volátiles totales y la trimetilamina (13).

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos en relación a las bases volátiles totales. Se puede notar un aumento de las mismas durante los 64 días de almacenamiento, lo cual se atribuye a la actividad bacteriana sobre las proteínas del pescado, desaminando aminoácidos y produciendo principalmente amonio; sin embargo, estos valores se encuentran muy por debajo de lo reportado por Rattagool y col (14), el cual indica valores de NBVT comprendidos entre 150,8-280,0 mg N/100 g de muestra, en ensilado de pescado fresco, obtenido mediante la técnica microbiana al cabo de 32 días de proceso.

El aumento de las bases volátiles totales está relacionado con la autólisis del ensilado, ya que en la medida que las enzimas degradan las proteínas hasta aminoácidos, péptidos, facilitan posteriormente la acción bacteriana. Enzimáticamente también se producen aminas y amonio, pero en una menor proporción (15).

Los resultados del análisis microbiológico se muestran en la Tabla 3. En la materia prima se puede observar un alto recuento de aerobios mesófilos, psicrófilos, enterobacterias, pseudomonas y hongos. También hay presencia de coliformes, *S. aureus*; lo cual es debido al aporte del pescado, melaza y frutas. No se detectó la presencia de *Salmonella* ni de *C. perfringens*. En el ensilado líquido sólo se observa la presencia de aerobios mesófilos, específicamente bacterias ácido lácticas, mientras que los microorganismos patógenos tales como, coliformes, *S. aureus* y demás microorganismos deteriorativos se encuentran restringidos debido fundamentalmente al bajo pH del producto, a las condiciones de «anaerobiosis» bajo las cuales es almacenado el mismo y la presencia de ciertas sustancias antibacterianas producidas por las bacterias ácido-lácticas, denominadas bacteriocinas, entre las cuales tenemos: nisina, lactato y peróxido de hidrógeno.

TABLE 3
ANALISIS MICROBIOLOGICO DE LA MATERIA PRIMA, EL ENSILADO DE PESCADO LIQUIDO Y EL ENSILADO DE PESCADO DESHIDRATADO

Microorganismos	Materia ¹ prima	Ensilado* líquido	Ensilado desh.tambor	Ensilado liofilizado
Aerobios mesófilos (UFC/g)	1.87x10 ⁷	120	< 10	510
Mohos y levaduras (UFC/g)	3.75x10 ³	< 10	< 10	< 10
Enterobacterias (UFC/g)	6.00x10 ³	< 10	< 10	< 10
Coliformes Totales y fecales (NMP/g)	≥ 2400	< 10	< 10	< 10
<i>E. coli</i> (NMP/g)	4	< 3	< 3	< 3
<i>S. aureus</i> (UFC/g)	2.75x10 ³	<100	<100	<100
<i>Pseudomonas</i> (UFC/g)	6.65x10 ⁴	<100	<100	<100
Psicrófilos (UFC/g)	2.07x10 ⁵	< 10	< 10	< 10
<i>C. perfringens</i> (UFC/g)	< 10	-	-	-
<i>Salmonella</i> sp (UFC/g)	No se encontró	-	-	-
Esporas aerobios (UFC/g)	-	-	20	260
Esp. anaerobios (UFC/g)	-	-	< 10	170

* Luego de 1 mes de almacenamiento

1: La materia prima está constituida por la mezcla pescado, melaza, frutas, sin inóculo. El ensilado si contiene inóculo.

En cuanto al recuento microbiano en el ensilado deshidratado tanto por tambor como por liofilización, se encontraron recuentos menores de 10 UFC/g en aerobios mesófilos, coliformes y hongos, lo cual es lógico si tomamos en cuenta las características del producto, el elevado grado de acidez conduce a un bajo valor de pH, el cual se torna restrictivo para una amplia gama de microorganismos. Adicionalmente se trata de un producto que ha sido sometido a un severo tratamiento térmico, como lo es el tipo de deshidratación que se efectuó, lo que provoca una disminución de la actividad de agua del producto, lo cual reduce aún más las posibilidades de desarrollo microbiano.

En el ensilado deshidratado se realizó un recuento de esporas debido a su resistencia, en este sentido se encontró presencia de esporas tanto de aerobios (260 UFC/g) como anaerobios (170 UFC/g), específicamente para el ensilado deshidratado por liofilización lo cual es debido a que el proceso de liofilización es menos drástico y por ende permite la supervivencia de ciertos microorganismos. Las esporas correspondieron a microorganismos Gram positivos, tipo bastones del género *Bacillus*. En el ensilado liofilizado también se encontraron aerobios mesófilos (510 UFC/g).

En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos en el análisis sobre metales tóxicos en el ensilado de pescado líquido. Se puede notar la presencia de cromo en niveles de 0,26 mg/kg; plomo 0,42 mg/kg y mercurio 0,3 mg/kg.

TABLE 4
METALES TOXICOS EN EL ENSILADO DE PESCADO LIQUIDO

Compuesto	Concentración (mg/kg)
Cromo	0.26
Plomo	0.42
Mercurio	0.30

Los Estados Unidos y Canadá no permiten un nivel superior de 0,5 mg de Hg/kg de pesado, mientras que el límite en Japón, Suecia y Finlandia es de 1 mg/kg. En Venezuela, COVENIN (16) tiene ciertos límites para sardina en conserva, en la cual el nivel de plomo es de 2 mg/kg y el mercurio 1 mg/kg; en atún en conserva, la concentración de plomo también es de 2 mg/kg y de mercurio es 0,5 mg/kg.

Según estos reportes, se puede observar que el ensilado microbiano se encuentran dentro de los límites permitidos en cuanto a los niveles de estos contaminantes.

La caracterización de la materia prima, ensilado de pescado líquido y ensilado deshidratado se presenta en la Tabla 5. En general se puede observar que no existen mayores cambios en los valores de humedad, cenizas, grasa y proteínas de la

materia prima y el ensilado líquido; por tanto el proceso de fermentación y licuefacción no afecta la composición proximal del producto. Al deshidratar, se pueden notar leves pérdidas de cenizas y proteínas con respecto a la materia prima, aunque los mayores cambios se presentan en el porcentaje de grasa, debido a la oxidación de la misma, lipólisis. No se muestran

mayores diferencias en el análisis proximal entre el ensilado deshidratado por tambor y el liofilizado; sin embargo, en el ensilado liofilizado la retención de compuestos volátiles responsables del aroma y sabor es alta con respecto al ensilado deshidratado por tambor, pero la liofilización es más costosa.

TABLA 5
ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LA MATERIA PRIMA, EL ENSILADO DE PESCADO LÍQUIDO Y EL ENSILADO DE PESCADO DESHIDRATADO

Determinación	Materia prima *		Ensilado líquido		Ensilado desh. tambor		Ensilado liofilizado	
	(BH)	(BS)	(BH)	(BS)	(BH)	(BS)	(BH)	(BS)
Humedad (%)	70.32	-	30.78	-	6.62	-	3.91	-
Cenizas (%)	5.15	17.36	4.65	15.92	13.11	14.04	14.15	14.73
Grasa (%)	1.88	6.32	1.76	6.04	2.67	2.86	3.02	3.14
Proteínas (%)	11.00	37.07	10.68	36.56	33.63	36.01	35.77	37.23
Mat. seca (%)	29.68	100.00	29.22	100.00	93.38	100.00	96.09	100.00

*: La materia prima está constituida por la mezcla pescado, melaza, frutas, sin inóculo. El ensilado si contiene inóculo.

CONCLUSIONES

1. Las determinaciones de pH, acidez, volátiles totales y el bajo recuento microbiano demuestran que el ensilado de pescado es un producto estable, que puede ser almacenado por largos períodos de tiempo sin mostrar deterioro alguno.
2. Los resultados del análisis sobre la presencia de metales tóxicos indican que el ensilado microbiano de pescado se encuentra dentro de los niveles permitidos, en cuanto a la concentración de plomo y mercurio.
3. El ensilado microbiano elaborado a partir de pescado eviscerado es un producto que muestra adecuadas características físico-químicas, microbiológicas y toxicológicas; por tanto puede ser utilizado para el consumo animal.

Agradecimiento

- A la Prof. Luisa Rossi (Facultad de Farmacia, U.C.V.) por la liofilización de las muestras de ensilado de pescado.
- A las Prof. Gladys de Galy y Berenice de García (Facultad de Farmacia, U.C.V.) por las determinaciones de plomo, cromo y mercurio en el ensilado líquido de pescado.

REFERENCIAS

1. Arbej J & Luna G. Propiedades funcionales y posibles usos de un hidrolizado de pepitona (*Arca Zebra*) en la elaboración de alimentos. Arch. Latinoamer. Nutri. 25(4):577-585, 1985.
2. Chung-Ling C. & Pigott G. Acidified brine extraction of fish. American Society of Agricultural Engineers, reprinted from transaction of the ASAE. 16(5): 949-952, 1973.
3. Ottati M. & Nello R.A. Ensilado microbiano de pescado en la alimentación porcina. I.- Valor nutritivo del producto en dietas para cerdos. Alimentaria 211:337-44, 1990.
4. Bertullo V.H. Desarrollo del ensilado en América Latian. 2da. Consulta de Expertos sobre tecnología de productos pesqueros en América Latina. FAO RLAC/2, 1-65, 1989.
5. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis of the AOAC. 13th ed. Washington, D.C. 1980.
6. Stansby M., Harrison R., Dason J. & Stater. Determining volatile basis in fish. Comparison of precision of certain methods. Industrial an Engineering Chemistry 16(9): 593-596, 1944.
7. Conway E. & Byrne A. An absortion apparatus for the microdetermination of certain volatile substances. The microdetermination of ammonia. Biochemistry Journal 27: 419-429, 1933.
8. International commision on Microbiological Specifications for Foods. Microorganismos de los alimentos. 1. Técnicas de análisis microbiológico. España, Ed. Acribia, 1978.
9. rojas C. Análisis microbiológico de Alimentos. Métodos generales. Leche y derivados,. Aguas, frutas, ambiente, 1987.

10. Van Wik, H & Heydenrich C. The production of naturally fermented fish silage using various Lactobacilli and different carbohydrate sources. *J. Sci. Food Agric.* 36 (11): 1093-1103, 1985.
11. Raa J. & Gildberg A. Autolysis and proteolytic activity of cod viscera. *J. Food Technol.* 11:619-628, 1976.
12. Tatterson I. & Windsor, M. Fish silage. *J. Sci. Food. Agric.* 25:369-379, 1974.
13. Martín R., Rodney J. & Pierson M. Quality Assessment of fresh fish and the role of the naturally occurring microflora. *Food Technol.* 32:188-192, 1978.
14. Rattagool P., Wongechinda N. & Swachatawongratana S. Studies on the nutritive value of fish silage for broiler chickens. In: *Proc. I.P.F.C Workshop Fish Silage. FAO Fish Rep.* 230: 48-54, 1980.
15. Huss H. El pescado fresco: su calidad y cambios de calidad. Colección FAO: Pesca 29, 1988. p.132.
16. COVENIN. Atún en conserva 1766-84. Método de ensayo: Plomo 1335. Mercurio 1407. Sardina en conserva 1087-84. Método de ensayo: Plomo 1335. Mercurio 1407.

Recibido: 09-04-1992

Aceptado: 18-10-1993