

ENSILAJES ACIDOS DE PESCADO. EFECTOS DEL PRECALENTAMIENTO Y ADICION DE ACIDOS FOSFORICO Y CITRICO SOBRE LA CALIDAD BIOQUIMICA

ACID FISH SILAGES. EFFECT OF PREHEATING AND ADDITION OF PHOSPHORIC AND CITRIC ACIDS ON THE BIOCHEMICAL QUALITY

María Teresa Viana¹
Carmen Nava-López²
Rafael Solana-Sansores³

¹ Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado postal 453
Ensenada 22800, Baja California, México

² Facultad de Ciencias Marinas
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado postal 453
Ensenada 22800, Baja California, México

³ Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado postal 1880
Ensenada 22800, Baja California, México

Recibido en mayo de 1993; aceptado en agosto de 1993

RESUMEN

Para determinar la efectividad de preservación, se ensiló macarela *Scomber japonicus*, sin cabeza ni espina dorsal, con dos mezclas diferentes de ácidos: sulfúrico y acético, y fosfórico y cítrico. Con el fin de establecer el grado de hidrólisis provocado por la actividad enzimática, parte del pescado destinado al ensilaje con ácidos fosfórico y cítrico se calentó y mantuvo a 60°C por cinco minutos. Durante 90 días, se tomaron y analizaron las muestras. Se encontró que el pH se conservó estable en los tres tratamientos. En el tratamiento precalentado, la actividad enzimática fue menor y el ensilaje más estable, con menor porcentaje de líquido, así como con menores cantidades de proteína soluble y aminoácidos libres. Después de 60 días de almacenamiento, se observó un incremento de la cantidad de bases volátiles totales en los productos de los tres tratamientos, lo cual indica inicio de descomposición, atribuible a las altas temperaturas de almacenamiento registradas durante el experimento. Se concluye que el ensilaje precalentado presenta diferencias sobre los otros dos tratamientos: menor porcentaje de hidrólisis y menores concentraciones de proteína soluble y aminoácidos libres.

Palabras clave: ensilaje, pescado, inactivación, nutrición.

ABSTRACT

Whole mackerel (*Scomber japonicus*), without head or spinal bone, were ensiled. In order to observe the preservative effect, two different acid mixtures were used: conventional sulfuric-acetic and phosphoric-citric. To establish the degree of hydrolysis caused by the endogenous enzymes

from the fish, enzyme activity was reduced by heating the fish mixture at 60°C for five minutes, before acid addition. Samples were taken for analysis during 90 days. The pH was stable in all groups throughout the experiment. In the preheated treatment, enzyme activity was lower and the silage more stable, with less percentage of liquid and lower amounts of soluble protein and free amino acids. After 60 days of storage, an increase in total volatile bases was observed in all products, corresponding to the beginning of a decomposition process, probably due to the high temperatures registered during the experiment. It is concluded that the preheated treatment has advantages in comparison to the other treatments, due to the lower hydrolysis which gives lower amounts of soluble protein and free amino acids.

Key words: silage, fish, inactivation, nutrition.

INTRODUCCION

Ensilar es el proceso de guardar alimento en un silo tratando de conservar sus características nutritivas (Gildberg, 1982), aunque no sus propiedades sensoriales. El ensilaje ácido de pescado es una manera de preservar productos pesqueros a temperatura ambiente mediante la adición de ácidos. La conservación del producto se logra por el efecto de los ácidos sobre las bacterias presentes. El producto terminado tiene consistencia líquida debido al alto grado de hidrólisis que se produce durante su almacenamiento, y contiene una alta concentración de aminoácidos libres. Por ello, no puede ser utilizado como única fuente alimenticia (Backhoff, 1976), pero se emplea como complemento alimenticio para animales domésticos y acuicultura (Hardy *et al.*, 1983; Windsor y Barlow, 1984; Åsgård y Austreng, 1986; Stone *et al.*, 1989). Se considera que la actividad enzimática (enzimas endógenas) es la causa principal de licuefacción en ensilajes de pescado, a consecuencia de la disminución del pH (Gildberg, 1982), y es la responsable directa de la hidrólisis de las proteínas aún después de mucho tiempo de almacenamiento. La hidrólisis da lugar a una gran producción de aminoácidos libres, que son inestables y se degradan (Stone y Hardy, 1986).

En el presente trabajo se elaboraron ensilajes de subproductos marinos utilizando una mezcla de ácidos orgánicos e inorgánicos: sulfúrico y acético, y fosfórico y cítrico. Con el fin de observar el efecto de las enzimas en la hidrólisis, se realizó un tratamiento cuya actividad enzimática fue reducida térmicamente, para disminuir el porcentaje de hidrólisis.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó macarela *Scomber japonicus* entera (125 kg), capturada en mayo de 1992,

INTRODUCTION

Ensiling is the process of storing food in a silo trying to conserve its nutritional characteristics (Gildberg, 1982), but not its sensory properties. Acid fish silage is a way of preserving fishery products at ambient temperature through the addition of acids. The preservation of the product is achieved by the effect of the acids on the bacteria present. The end product has a liquid consistency due to the high degree of hydrolysis produced during its storage, and contains a high concentration of free amino acids. Therefore, it cannot be used as the only source of food (Backhoff, 1976), but it is used as a food additive for domestic animals and in aquaculture (Hardy *et al.*, 1983; Windsor and Barlow, 1984; Åsgård and Austreng, 1986; Stone *et al.*, 1989). Enzymatic activity (endogenous enzymes) is considered the main cause of liquefaction in fish silages, as a result of the decrease in pH (Gildberg, 1982), and is directly responsible for the hydrolysis of the proteins even after a long storage period. Hydrolysis causes a large production of free amino acids, which are unstable and degrade (Stone and Hardy, 1986).

In this study, silages of marine sub-products were prepared using a mixture of organic and inorganic acids: sulfuric-acetic and phosphoric-citric. In order to observe the effect of enzymes on hydrolysis, a treatment was carried out in which enzymatic activity was thermally reduced to decrease the percentage of hydrolysis.

MATERIALS AND METHODS

Whole mackerel, *Scomber japonicus* (125 kg), caught in May 1992 off Ensenada, Baja California (Mexico), was used. The fresh fish, without head or spinal bone, was passed through a meat grinder with a particle size of

en la zona de Ensenada, Baja California (México). El pescado se molió fresco, sin cabeza ni espina dorsal, en un molino de carne, a un tamaño aproximado de partícula de 0.5 cm. La carne triturada se homogeneizó con cucharas de madera manualmente, durante 30 minutos. Se tomó una muestra de 100 g, que se almacenó a -25°C , para analizarla después en laboratorio.

El pescado molido se dividió en tres partes iguales. Una se calentó hasta 60°C y se mantuvo a esa temperatura cinco minutos. Se separó una muestra de esta parte y se almacenó a -25°C para analizarla después en laboratorio. La adición de los ácidos a la materia prima se realizó cuando ésta alcanzó una temperatura aproximada de 30°C . A dos partes (la previamente calentada y una cruda) se les agregó por separado 2.6% (v/p) de ácido fosfórico, 3% (p/p) de ácido cítrico y 0.1% (p/p) de benzoato de sodio (como conservador). Los ensilajes se homogeneizaron a mano por espacio de 30 minutos, y constituyeron los tratamientos AFC (activado fosfórico cítrico) e IFC (inactivo, o sea precalentado, fosfórico cítrico). A la tercera parte de pescado (crudo), se le agregó ácido sulfúrico hasta que alcanzó un pH de 3, posteriormente, se añadió 2% (v/p) de ácido acético y 0.1% (p/p) de benzoato de sodio, y se homogeneizó de igual manera. Este tratamiento, ASA (activado sulfúrico acético), se utilizó como control.

Los tres ensilajes se dividieron, y se obtuvieron tres réplicas de cada uno (tabla 1), que se almacenaron a temperatura ambiente, en nueve contenedores (20 l de capacidad) de plástico con tapa. Durante los primeros días de almacenamiento, el ensilaje se mezcló diariamente, para garantizar un producto homogéneo, de acuerdo con lo propuesto por Neave (1986).

Toma de muestras

Se tomaron muestras de macarela cruda y calentada, con el fin de comparar la materia prima antes de añadir los ácidos. Para la toma de muestras, primero se mezcló perfectamente el ensilaje con un cucharón de madera. Después, se tomaron del centro del silo 100 ml de ensilaje, en una probeta. Las muestras se guardaron en bolsas de plástico por triplicado (nueve réplicas, en total) y se almacenaron a

aproximadamente 0.5 cm. The minced meat was homogenized manually with wooden spoons for 30 minutes. A sample of 100 g was taken and stored at -25°C for its subsequent analysis in the laboratory.

The minced fish was divided into three equal parts. One was heated at 60°C for five minutes. A sample of this part was separated and stored at -25°C . The acids were added to the raw material when it reached a temperature of approximately 30°C . To two parts (one raw and one preheated), 2.6% (v/w) of phosphoric acid, 3% (w/w) of citric acid and 0.1% (w/w) of sodium benzoate (as preservative) were added separately. The silages were homogenized manually for 30 minutes, and they constituted the AFC (activated phosphoric-citric) and IFC (inactivated, *i.e.* preheated, phosphoric-citric) treatments. To the third (raw) part of fish, sulfuric acid was added until it reached a pH of 3; then, 2% (v/w) of acetic acid and 0.1% (w/w) of sodium benzoate were added, and it was homogenized in the same way. This treatment, ASA (activated sulfuric-acetic), was used as control.

The three silages were divided and three replicas of each were obtained (table 1), which were stored at ambient temperature in nine 20-l covered plastic containers. During the first days of storage, the silage was mixed daily in order to guarantee a homogeneous product, according to that proposed by Neave (1986).

Taking of samples

Samples of raw and heated mackerel were taken in order to compare the raw material before adding the acids. For the taking of samples, first the silage was mixed very well with a wooden spoon. Then, 100 ml of silage were removed from the centre of the silo with a beaker. The samples were placed in plastic bags in triplicate (nine replicas in total) and stored at -25°C for their subsequent analysis. The samplings were made on days 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 and 90.

Chemical analyses

The percentage of liquid was obtained using a relative centrifugal force (RCF) of 16,000 x g for 20 minutes, and measuring the

-25°C, para ser analizadas posteriormente. Los muestreos se realizaron los días 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 y 90.

Análisis químicos

El porcentaje de líquido se obtuvo utilizando fuerza centrífuga relativa (FCR) de 16,000 x g, durante 20 minutos, y midiendo el volumen del líquido con respecto al sólido. La actividad enzimática fue determinada de acuerdo con el método de Barret (1972). La estimación de proteína soluble se realizó, a partir de una alícuota del sobrenadante después de centrifugar una muestra del ensilaje a 16,000 x g por 20 minutos, con el método de Lowry *et al.* (1951), y utilizando albúmina de suero de bovino (BSA) para la curva de calibración. Los resultados se presentan en microgramos y miligramos de proteína equivalente a BSA por gramo de ensilaje, y las cifras fueron transformadas en miligramos para el análisis estadístico. Los aminoácidos libres se calcularon después de adicionar un 10% de ácido tricloroacético (TCA) a la fase líquida de los ensilajes, para precipitar la proteína; los aminoácidos libres y péptidos permanecen en el sobrenadante. La cuantificación se realizó con el método de Lowry *et al.* (1951). Los resultados se indican en microgramos y miligramos de proteína por gramo de ensilaje, y las cifras fueron transformadas en miligramos para el análisis estadístico. La determinación de BVT (bases volátiles totales), TMA (trimetilamina) y amonio, se realizó con el método de Conway (1933) modificado. En este método, las BVT representan la suma de amonio y TMA, que conforma las

volume of the liquid with respect to the solid. Enzymatic activity was determined following the method of Barret (1972). Soluble protein was estimated by taking a sample of the supernatant after centrifuging a silage sample at 16,000 x g for 20 minutes, with the method of Lowry *et al.* (1951), using bovine serum albumin (BSA) for the calibration curve. The results are given in micrograms and milligrams of protein equivalent to BSA per gram of silage, and the figures were converted into milligrams for the statistical analysis. The free amino acids were calculated after adding 10% of trichloroacetic acid (TCA) to the liquid phase of the silages, to precipitate the protein, the free amino acids and peptides remaining in the supernatant. Quantification was made using the method of Lowry *et al.* (1951). The results are given in micrograms and milligrams of protein per gram of silage, and the figures were transformed into milligrams for the statistical analysis. The total volatile bases (TVB), trimethylamine (TMA) and ammonia were determined with the modified method of Conway (1933), in which the TVB represent the sum of ammonia and TMA, which comprises nearly all of the volatile bases, since only traces of mono- and dimethylamine are found (Gildberg, 1982). Ammonia is determined with the same procedure, adding formalin so that it is released in gaseous form, and TMA is estimated as the difference between the amount of TVB and ammonia. The samples were prepared by adding 10% of TCA, and the results are given in $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ of silage. The oil of the raw material was analysed with the method of Bligh and Dyer (1959).

Tabla 1. Composición de los diferentes tratamientos AFC, IFC y ASA.
Table 1. Composition of the AFC, IFC and ASA treatments.

Ingredientes	AFC	IFC	ASA
Macarela molida	cruda	precalentada	cruda
A. fosfórico	2.6% (v/p)	2.6% (v/p)	-
A. cítrico	2.6% (p/p)	2.6% (p/p)	-
A. sulfúrico	-	-	pH 3
A. acético			2% (p/p)
Benzoato de Na	0.1% (p/p)	0.1% (p/p)	0.1% (p/p)

bases volátiles casi en su totalidad, ya que sólo hay trazas de mono y dimetilamina (Gildberg, 1982); el amonio se determina bajo el mismo procedimiento, adicionando formalina para que se desprenda en forma gaseosa, y la TMA se estima como la diferencia entre la cantidad de BVT y amonio. Las muestras se prepararon añadiendo 10% de TCA, y los resultados se indican en $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ de ensilaje. La grasa cruda de la materia prima fue analizada mediante el método de Bligh y Dyer (1959).

Analisis de datos

Se realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA), para las variables de pH, BVT, porcentaje de líquido y proteína soluble, con el fin de comparar los diferentes niveles de tratamiento, bajo un esquema de diseño experimental simple, completamente aleatorizado. Debido a que se detectaron diferencias significativas en, por lo menos, dos tratamientos, se procedió a comparar los diferentes niveles a través de la prueba *a posteriori* de Tukey (Morrison, 1976; Steel y Torrie, 1988).

En virtud de que no se presentó una estabilización de las varianzas, las variables de porcentaje de líquido y proteína soluble fueron tratadas en forma separada para la comparación entre los diferentes tratamientos, utilizando la prueba de hipótesis no paramétrica de Kruskal Wallis (Steel y Torrie, 1988).

RESULTADOS

Materia prima

Los resultados de los análisis del pescado crudo y precalentado se presentan en la tabla 2. Con excepción de los análisis de actividad enzimática, los resultados son similares, ya que las diferencias entre sus valores no son significativas. La actividad enzimática del pescado crudo y precalentado muestra valores significativos, de 33.0 y 4.7 $\mu\text{mol Tyr eq/ml}$, respectivamente.

Temperatura y pH

El promedio de las mediciones de pH de los tratamientos y la temperatura ambiente a la cual se almacenaron se muestra en la tabla 3. En el empleo de los ácidos fosfórico y cítrico, la mezcla proporcionó un pH de 3.4,

Data analysis

A multivariate analysis of variance (MANOVA) was carried out for the variables pH, TVB, percentage of liquid and soluble protein, in order to compare the different levels of treatment, following a simple experimental design. Since significant differences were detected in at least two treatments, the different levels were compared using the *a posteriori* Tukey test (Morrison, 1976; Steel and Torrie, 1988).

Since the variables percentage of liquid and soluble protein did not present stabilization of the variances, they were treated separately in order to compare the different treatments, using the Kruskal-Wallis non-parametric test (Steel and Torrie, 1988).

RESULTS

Raw material

The results of the analyses of raw and preheated fish are presented in table 2. Except for the analysis of enzymatic activity, the results are similar, since there were no significant differences between their values. The enzymatic activity of the raw and preheated fish shows significant values, 33.0 and 4.7 $\mu\text{mol Tyr eq/ml}$, respectively.

Temperature and pH

The mean values of pH of the treatments and of the ambient temperature at which they were stored are given in table 3. When phosphoric and citric acids were used, the mixture presented a pH of 3.4 in both the raw and preheated fish (AFC and IFC, respectively), whereas a pH of 2.7 was recorded in the ASA treatment, after adding the sulfuric and acetic acids.

During the storage period, the maximum pH values, recorded on day 90, were 3.8, 3.6 and 3.2 for AFC, IFC and ASA, respectively. This indicates an increase, with respect to the initial values, of 0.4 for AFC, 0.2 for IFC and 0.5 for ASA.

The analysis of variations in pH until day 60 showed that the behaviour of the ASA silage was significantly different than that of the other two ($p < 0.05$), with a more acidic pH value. However, differences between the

Tabla 2. Características iniciales de la materia prima. Pescado molido, crudo y precalentado antes de mezclar los ácidos.

Table 2. Initial characteristics of the raw material. Raw and preheated minced fish, before adding the acids.

	Pescado crudo	Pescado precalentado
pH	6.1	6.2
Porcentaje de líquido	1.0	1.0
Actividad enzimática	33.0 μ mol Tyr eq/ml x h	4.7 μ mol Tyr eq/ml x h
Proteína soluble	37 μ g proteína /g de ensilaje	13 μ g proteína /g de ensilaje
Aminoácidos libres	15 μ g proteína /g de ensilaje	13 μ g proteína /g de ensilaje
TMA	0.0	0.0
Grasa cruda	14.7 %	14.7 %

Tabla 3. Valores promedio de pH de los tratamientos AFC, IFC y ASA, y de la temperatura ambiente a la que fueron almacenados.

Table 3. Mean values of pH of the AFC, IFC and ASA treatments, and of the ambient temperature at which they were stored.

Día	AFC pH	S σ	IFC pH	S σ	ASA pH	S σ	T, C $^{\circ}$ (ambiente)
0	3.40	0.00	3.40	0.00	2.70	0.00	24
1	3.31	0.05	3.23	0.04	2.51	0.11	24
2	3.43	0.07	3.31	0.02	2.62	0.13	24
3	3.50	0.07	3.36	0.04	2.66	0.12	23
5	3.53	0.08	3.36	0.02	2.68	0.11	24
7	3.55	0.08	3.37	0.03	2.71	0.12	24
9	3.53	0.09	3.34	0.03	2.70	0.13	24
15	3.65	0.11	3.54	0.04	2.56	0.36	26
20	3.94	0.06	3.69	0.04	3.15	0.05	27
25	3.73	0.12	3.61	0.16	3.40	0.08	29
30	4.18	0.08	3.79	0.04	3.41	0.09	29
40	3.99	0.08	3.60	0.10	3.09	0.08	30
50	3.80	0.03	3.60	0.02	3.11	0.09	33
60	3.78	0.07	3.57	0.01	3.10	0.12	35
90	3.80	0.08	3.60	0.02	3.20	0.07	33

tanto en el pescado crudo como en el precalentado (AFC e IFC, respectivamente), mientras que en el tratamiento ASA se registró un pH de 2.7, después de mezclarle los ácidos sulfúrico y acético.

Durante el tiempo de almacenamiento, los valores máximos de pH registrados a los 90 días fueron de 3.8, 3.6 y 3.2, para AFC, IFC y ASA, respectivamente, lo que indica un incremento con respecto al inicio de 0.4 para AFC, 0.2 para IFC y 0.5 para ASA.

Analizando las variaciones de pH hasta los 60 días, se observó que el ensilaje ASA tuvo un comportamiento significativamente diferente a los otros dos ($p < 0.05$), y un valor de pH más ácido. Sin embargo, no se registraron diferencias entre los incrementos de 60 a 90 días para este parámetro ($p > 0.05$).

La temperatura ambiente a la que fueron almacenados los ensilajes varió entre 23 y 35°C. La mayor temperatura registrada corresponde al día 60 y la menor al tercer día (tabla 3).

Porcentaje de líquido

El comportamiento de los ensilajes con respecto a la cantidad de líquido presente en cada uno de ellos durante su tiempo de almacenamiento, se muestra en la Fig. 1. Los tratamientos AFC y ASA presentaron una tendencia a aumentar el porcentaje de líquido durante los primeros 20 días. Para ambos ensilajes, el valor mínimo correspondió al día cero, con 24.3% y 47.9%, respectivamente, y el máximo al día 90, con 65.0% y 59.5%, respectivamente. El porcentaje de líquido fue estable en los dos tratamientos, entre los días 20 y 25 de almacenamiento (Fig. 1). En el tratamiento IFC, el porcentaje de líquido se mantuvo constante, con valores entre 41.2 y 45.7%, al inicio y final del tiempo de almacenamiento, respectivamente. En cuanto al incremento a los 60 días, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). En el incremento de 60 a 90 días, se registraron igualmente diferencias significativas ($p < 0.05$), y los valores más altos correspondieron al tratamiento AFC.

Actividad enzimática

En la Fig. 2 se presentan las curvas que describen los valores promedio de la actividad enzimática para AFC, IFC y ASA, durante el

incremento desde el día 60 hasta el día 90, no se observó para este parámetro ($p > 0.05$).

La temperatura ambiente a la que los ensilajes fueron almacenados varió entre 23 y 35°C. La mayor temperatura registrada corresponde al día 60 y la menor al tercer día (tabla 3).

Porcentaje de líquido

El comportamiento de los ensilajes con respecto a la cantidad de líquido presente en cada uno de ellos durante su tiempo de almacenamiento, se muestra en la Fig. 1. En los tratamientos AFC y ASA, el porcentaje de líquido tendió a aumentar durante los primeros 20 días. Para ambos ensilajes, el valor mínimo correspondió al día cero, con 24.3% y 47.9%, respectivamente, y el máximo al día 90, con 65.0% y 59.5%, respectivamente. El porcentaje de líquido fue estable en ambos tratamientos entre los días 20 y 25 (Fig. 1). En el tratamiento IFC, el porcentaje de líquido permaneció constante, con valores de 41.2% al inicio y 45.7% al final del tiempo de almacenamiento. Respecto al incremento después de 60 días, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). En el incremento desde el día 60 hasta el día 90, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$), y los valores más altos correspondieron al tratamiento AFC.

Actividad enzimática

Las curvas que describen los valores promedio de la actividad enzimática para AFC, IFC y ASA durante el tiempo de almacenamiento, se muestran en la Fig. 2. Las curvas de actividad enzimática de AFC y ASA muestran tendencias similares de disminución con el tiempo de almacenamiento, desde 26.1 a 23.3 y desde 30.7 a 15.9 $\mu\text{mol Tyr eq/ml} \times \text{h}$, respectivamente. En el tratamiento IFC, los valores de actividad enzimática fueron muy bajos desde el inicio, comparados con los de los otros dos tratamientos, pasando de 2.7 a 0.2 $\mu\text{mol Tyr eq/ml} \times \text{h}$, al inicio y al final del tiempo de muestreo, respectivamente (Fig. 2).

Proteína soluble

Los valores promedio de la cantidad de proteína soluble encontrada en los ensilajes AFC, IFC y ASA durante el tiempo de almacenamiento, se muestran en la Fig. 3. El contenido de proteína soluble en el pescado crudo varió desde 37 μg hasta 8.6 mg de proteína por gramo en el ensilaje AFC, y desde 37 μg hasta 17.3 mg de proteína por gramo en el

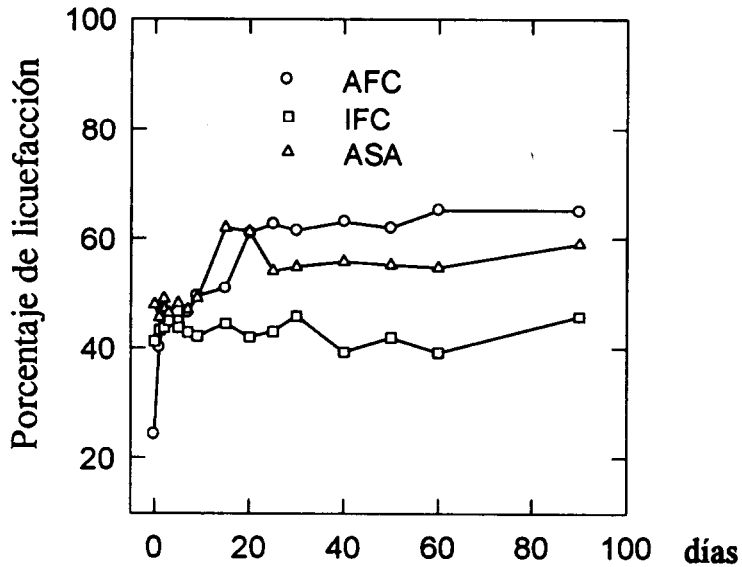


Figura 1. Valores promedio del porcentaje de líquido en los ensilajes AFC, IFC y ASA, durante su almacenamiento.

Figure 1. Mean values of the percentage of liquid in the AFC, IFC and ASA silages, during their storage.

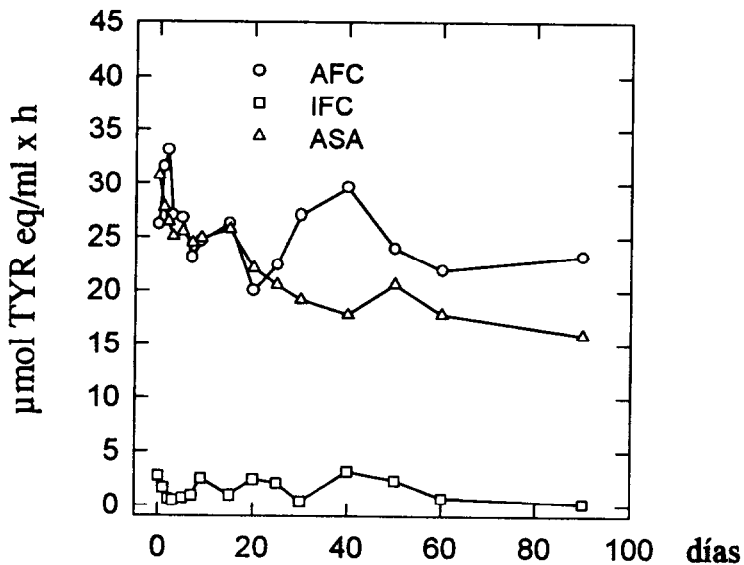


Figura 2. Actividad enzimática de los diferentes ensilajes, dada en $\mu\text{mol Tyr eq/ml} \times \text{h}$, utilizando hemoglobina como sustrato.

Figure 2. Enzymatic activity of the different silages, in $\mu\text{mol Tyr eq/ml} \times \text{h}$, using haemoglobin as substrate.

tiempo de almacenamiento. Las curvas de actividad enzimática de AFC y ASA muestran tendencias similares de disminución conforme transcurre el tiempo de almacenamiento de los ensilajes, de 26.1 a 23.3 y de 30.7 a 15.9 $\mu\text{mol Tyr eq/ml} \times \text{h}$, respectivamente. En el tratamiento IFC se observan valores muy bajos de actividad desde el inicio, en comparación con los otros dos tratamientos, que van de 2.7 a 0.2 $\mu\text{mol Tyr eq/ml} \times \text{h}$, al inicio y final del muestreo, respectivamente (Fig. 2).

Proteína soluble

En la Fig. 3, se muestra la gráfica con los resultados promedio de la cantidad de proteína soluble presente en los ensilajes AFC, IFC y ASA, durante el tiempo de almacenamiento. El contenido de proteína soluble en el pescado crudo varió de 37 μg a 8.6 mg de proteína por gramo en el ensilaje AFC, así como de 37 μg a 17.3 mg de proteína por gramo en el tratamiento ASA. También se observaron cambios de proteína soluble en la elaboración del IFC, ya que el pescado precalentado presentó valores de 38 μg , que aumentaron a 14.5 mg de proteína por gramo. A los 60 días, la diferencia entre tratamientos fue significativa ($p < 0.05$). Los tratamientos AFC y ASA tendieron a aumentar la cantidad de proteína soluble durante los primeros 20 y 15 días, respectivamente, cuando se estabilizaron los valores, que se mantuvieron constantes durante el resto del muestreo (Fig. 3).

Se observaron diferencias significativas entre los diversos tratamientos, en los incrementos de proteína soluble ($p < 0.05$). Así, el tratamiento IFC tuvo los incrementos más bajos con respecto a este parámetro, ya que el tratamiento AFC varió de 8.6 mg de proteína por gramo de ensilaje, el día cero, a 22.1 mg de proteína por gramo de ensilaje, el día 90. El ensilaje ASA cambió de 17.1 a 25.6 mg de proteína por gramo de ensilaje, mientras que el tratamiento IFC, osciló entre 14.5 y 17.8 mg de proteína por gramo de ensilaje, con una cantidad promedio de 15.4 mg de proteína por gramo de ensilaje.

Aminoácidos libres

Las curvas de la Fig. 4 muestran el comportamiento de los valores promedio de la cantidad de aminoácidos libres presentes en los diferentes tratamientos, durante el tiempo de almacenamiento. La cantidad de aminoáci-

ASA treatment. Changes in soluble protein were also observed in the preparation of IFC, since the preheated fish presented values of 38 μg , increasing to 14.5 mg of protein per gram. After 60 days, the difference between treatments was significant ($p < 0.05$). In the AFC and ASA treatments, the amount of soluble protein tended to increase during the first 20 and 15 days, respectively, when the values stabilized, and remained constant during the rest of the sampling (Fig. 3).

There were significant differences in the increases of soluble protein between the treatments ($p < 0.05$). The IFC treatment had the lowest increases in regard to this parameter. The AFC treatment ranged from 8.6 mg of protein per gram of silage, on day zero, to 22.1 mg of protein per gram of silage, on day 90. The ASA silage ranged from 17.1 to 25.6 mg of protein per gram of silage, whereas the IFC treatment varied between 14.5 and 17.8 mg of protein per gram of silage, with an average amount of 15.4 mg of protein per gram of silage.

Free amino acids

The curves in Fig. 4 show the behaviour of the mean values of the amount of free amino acids in the different treatments, during the storage period. The amount of free amino acids in the raw fish (15 μg of protein per gram) changed after the acids were added to prepare the AFC and ASA treatments, and values of 0.7 and 1.2 mg of protein per gram, respectively, were obtained. It was also modified in the IFC treatment, changing from 13 μg in the preheated fish to 1.0 mg of protein per gram of silage after acid addition. The AFC and ASA silages showed similar increasing trends during the sampling process (Fig. 4). In the AFC treatment, values of 0.7 and 2.0 mg of protein per gram of silage were recorded on days zero and 90, respectively, while in the ASA treatment, values increased from 1.2 to 1.9 mg of protein per gram of silage between days zero and 90. The amount of free amino acids in the IFC treatment varied between 0.9 and 1.3 mg of protein per gram of silage, with a mean value of 1.1 mg, during the sampling process.

Total volatile bases

The curves that describe the mean results of the amount of TVB determined in

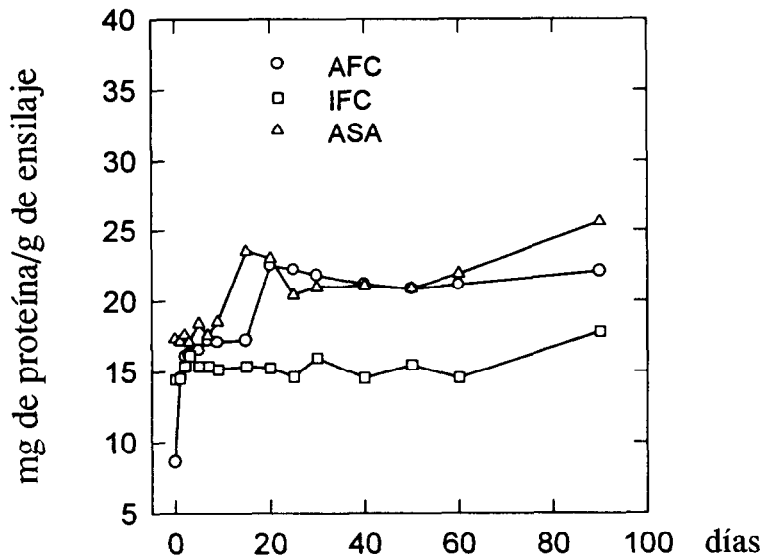


Figura 3. Proteína soluble en los diferentes ensilajes, dada en miligramos de proteína por gramo de ensilaje.

Figure 3. Soluble protein in the different silages, in milligrams of protein per gram of silage.

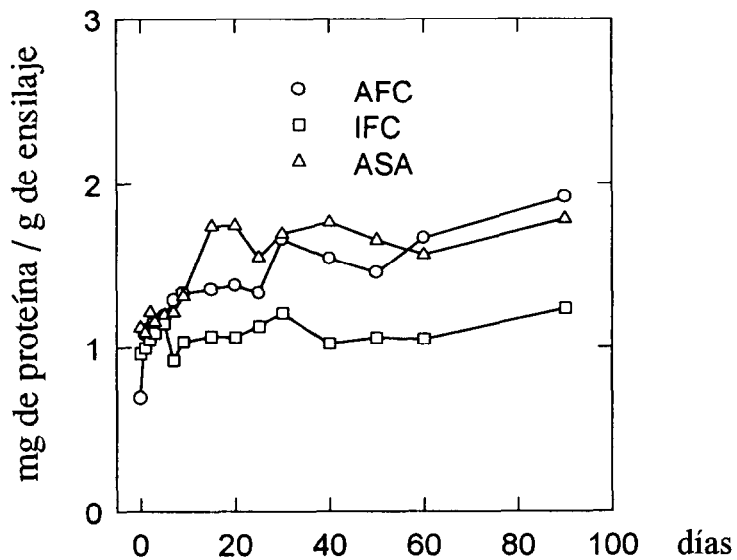


Figura 4. Cantidad de aminoácidos libres en los diferentes tratamientos, dada en miligramos de proteína por gramo de ensilaje.

Figure 4. Amount of free amino acids in the different treatments, in milligrams of protein per gram of silage.

dos libres presente en el pescado crudo molido (15 μg de proteína equivalente/g), se modificó después de la adición de los ácidos al elaborar los tratamientos AFC y ASA, y se obtuvieron los valores de 0.7 y 1.2 mg de proteína por gramo, respectivamente. También se modificó en el tratamiento IFC, donde el valor de 13 μg del pescado precalentado cambió a 1.0 mg de proteína por gramo de ensilaje, después de añadir los ácidos para el tratamiento. Los ensilajes AFC y ASA presentaron tendencias semejantes a aumentar durante todo el proceso de muestreo (Fig. 4). El tratamiento AFC mostró valores de 0.7 y 2.0 mg de proteína por gramo de ensilaje, para los días cero y 90, respectivamente, mientras que el ASA incrementó sus valores de 1.2 a 1.9 mg de proteína por gramo de ensilaje, entre el día cero y 90. La cantidad de aminoácidos libres en el tratamiento IFC osciló entre 0.9 y 1.3 mg de proteína por gramo de ensilaje, con un valor promedio de 1.1 mg, durante el proceso de muestreo.

Bases volátiles totales

En la Fig. 5 se presentan las curvas que describen los resultados promedio de la cantidad de BVT determinada en las réplicas de los ensilajes AFC, IFC y ASA, dada en $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ de ensilaje, durante el tiempo de almacenamiento. El análisis estadístico para el incremento de BVT en 60 días indicó que no existen diferencias entre los tratamientos ($p > 0.05$). El ensilaje AFC se mantuvo con un incremento constante durante 50 días, de 52.0 a 103.0 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$; posteriormente sufrió un incremento mayor entre los días 50 y 90, y alcanzó 223.3 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$. El ensilaje IFC presentó un comportamiento constante durante 60 días, con un promedio de 80.2 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$, y se incrementó los últimos 30 días del estudio hasta 243.3 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$. Los resultados de los análisis del ensilaje ASA muestran que éste tendió a incrementar las BVT, ya que tuvo valores de 54.7 a 96.0 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ para los días 0 y 60, respectivamente, y alcanzó, el día 90, 246.7 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ ($p > 0.05$).

Trimetilamina

La gráfica de los valores promedio de la cantidad de trimetilamina encontrada en los ensilajes AFC, IFC y ASA, durante el tiempo de muestreo, se presenta en la Fig. 6. En

the replicas of the AFC, IFC and ASA silages, in $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ of silage, during the storage period, are shown in Fig. 5. The statistical analysis of the increase in TVB until day 60 indicated that there were no significant differences between the treatments ($p > 0.05$). The AFC silage had a constant increase during the first 50 days, from 52.0 to 103.0 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$, and then increased considerably between days 50 and 90, reaching 223.3 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$. The IFC silage presented a constant behaviour for 60 days, with an average of 80.2 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$, and then increased during the last 30 days until reaching 243.3 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$. The TVB tended to increase in the ASA silage, with values ranging from 54.7 to 96.0 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ between days zero and 60, respectively, and increasing to 246.7 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ by day 90 ($p > 0.05$).

Trimethylamine

The mean values of the amount of trimethylamine found in the AFC, IFC and ASA silages during the sampling are shown in Fig. 6. In general, the amount of trimethylamine tended to increase with longer storage. In the AFC treatment, the minimum value corresponded to day zero, with 36.7 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ of silage, and the maximum value to day 90, with 80.0 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ of silage. In the IFC treatment, the minimum value corresponded to day zero, with 28.0 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ of silage, and the maximum value to day 90, with 110 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ of silage. Likewise, the ASA silage had a minimum value of 23.0 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ on day zero, and a maximum value of 130 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ on day 90.

Ammonia

The curves in Fig. 7 correspond to the mean amounts of ammonia found in the AFC, IFC and ASA treatments during the sampling. In the AFC silage, the concentration of ammonia remained constant for 25 days, with 15.0 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$, and then began to increase on day 30, reaching 126.7 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ on day 90. In the IFC silage, the amount of ammonia remained constant until day 60, with 28.1 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$, and then increased to 133.3 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ by day 90. In the ASA silage, the ammonia concentration remained constant until day 60, with values of 18.4 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$, and then increased to 116.7 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ by day 90.

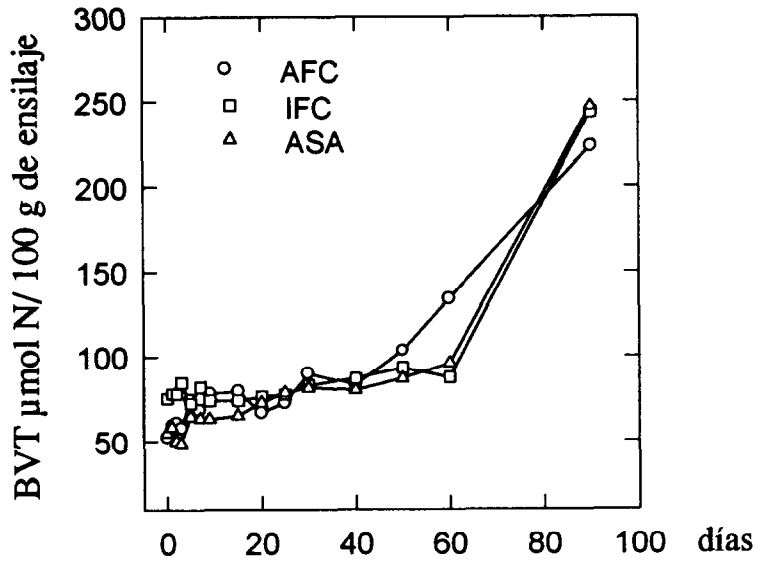


Figura 5. Bases volátiles totales (BVT) en los ensilajes AFC, IFC y ASA, en $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ de ensilaje.

Figure 5. Total volatile bases (TVB) in the AFC, IFC and ASA silages, in $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ of silage.

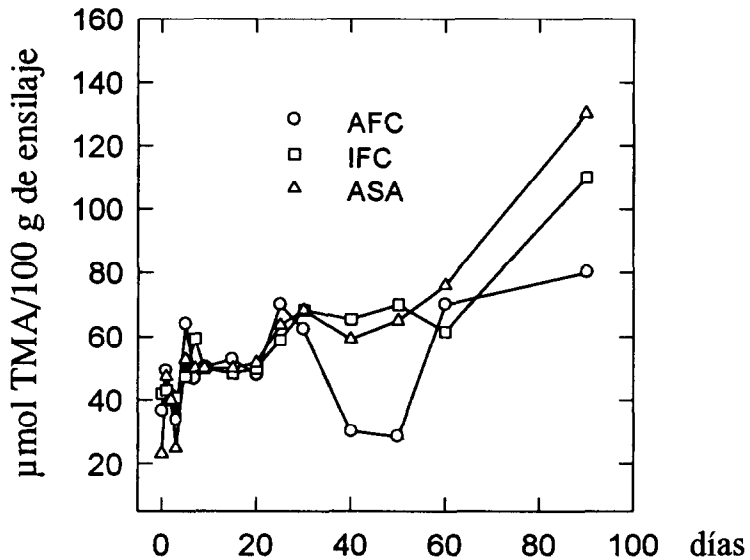


Figura 6. Cantidad de trimetilamina (TMA), dada en $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ de ensilaje.

Figure 6. Amount of trimethylamine (TMA), in $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ of silage.

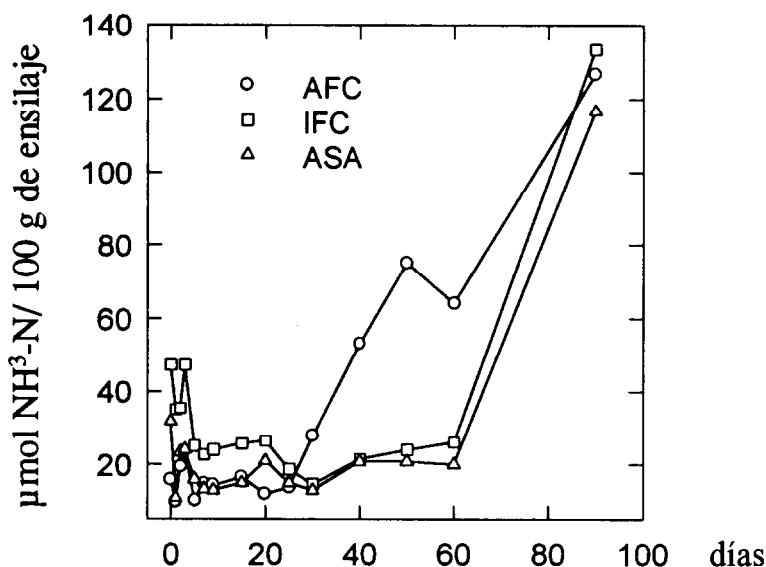


Figura 7. Cantidad de amonio en los ensilajes AFC, IFC y ASA, dada en $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ de ensilaje.

Figure 7. Amount of ammonia in the AFC, IFC and ASA silages, in $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ of silage.

general, la cantidad de trimetilamina tendió a aumentar conforme pasó el tiempo de almacenamiento. Para el tratamiento AFC, el valor mínimo correspondió al día cero, con $36.7\ \mu\text{mol N}/100\text{ g}$ de ensilaje, y el máximo al día 90, con $80.0\ \mu\text{mol N}/100\text{ g}$ de ensilaje. En el tratamiento IFC, el valor mínimo correspondió al día cero, con $28.0\ \mu\text{mol N}/100\text{ g}$ de ensilaje, y el máximo al día 90, con $110\ \mu\text{mol N}/100\text{ g}$ de ensilaje. Igualmente, el ensilaje ASA tuvo un valor mínimo de $23.0\ \mu\text{mol N}/100\text{ g}$, el día cero, y un valor máximo de $130\ \mu\text{mol N}/100\text{ g}$, el día 90.

Amonio

Las curvas de la Fig. 7 corresponden a los promedios de cantidad de amonio presente en los tratamientos AFC, IFC y ASA durante el muestreo. En el ensilaje AFC, la concentración de amonio se mantuvo constante, con $15.0\ \mu\text{mol N}/100\text{ g}$ hasta el día 25; posteriormente, hubo un incremento en la concentración a partir del día 30 y alcanzó a tener $126.7\ \mu\text{mol N}/100\text{ g}$ el día 90. En el ensilaje IFC, se mantuvo constante la cantidad de amonio hasta el día 60, con $28.1\ \mu\text{mol N}/100\text{ g}$,

DISCUSSION

The results of the pH measurements and of the amount of trimethylamine indicated, according to Neave (1986), that the raw fish was fresh (table 2). This characteristic is important because it is known that the silage can preserve the qualities of the fish, but cannot improve them (Ray and Gildberg, 1982).

The evaluation of enzymatic activity for the raw fish was high with respect to the values of the preheated fish. This difference is attributed to enzyme inactivation, due to the preheating (table 2).

The low amounts of soluble protein and free amino acids in the raw fish at time zero (table 2), indicate a low degree of autolysis at this level. In the preheated fish, the soluble protein and free amino acids were equally low; however, it is known that at that temperature, a partial process of protein denaturation occurs (Sikorski *et al.*, 1984; Chan *et al.*, 1992).

The addition of acids is the main factor to obtain stable silages (Raa *et al.*, 1983).

y se incrementó la concentración el día 90, cuando alcanzó 133.3 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$. En el ensilaje ASA, se mantuvo constante la concentración de amonio, con valores de 18.4 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ hasta el día 60 y llegó a 116.7 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ el día 90.

DISCUSION

Los resultados de las mediciones de pH y de la cantidad de trimetilamina demostraron, de acuerdo con Neave (1986), que el pescado crudo se encontraba en buen estado de frescura (tabla 2). Esta característica es importante, ya que se sabe que el ensilaje puede conservar las cualidades del pescado, mas no mejorarlas (Raa y Gildberg, 1982).

La evaluación de la actividad enzimática para el pescado crudo fue alta con respecto a los valores del pescado precalentado. Tal diferencia se atribuye al proceso de inactivación de las enzimas, debido al precalentamiento (tabla 2).

La baja cantidad de proteína soluble y de aminoácidos libres en el pescado crudo, en el tiempo cero (tabla 2), demuestran un bajo grado de autólisis en este nivel. En el pescado precalentado, la proteína soluble y aminoácidos libres fueron igualmente bajos, no obstante, se sabe que a esa temperatura ocurre un proceso parcial de desnaturalización protéica (Sikorski *et al.*, 1984; Chan *et al.*, 1992).

La adición de los ácidos es el factor principal para obtener ensilajes estables (Raa *et al.*, 1983). De acuerdo con Raa y Gildberg (1982) y Hansen (1981), cuando no se logra una mezcla inicial suficientemente homogénea, se da lugar a microambientes extremos, es decir, zonas donde hay pH muy alto y otras donde está muy bajo. El pH registrado en los tres tratamientos (tabla 3), después de revolver los ensilajes para la toma de muestras, indica que hubo una homogeneización inicial buena de los ácidos en todos ellos, ya que durante los 90 días de muestreo éstos sufrieron variaciones mínimas dentro de los valores aceptados de pH, de acuerdo con Raa y Gildberg (1982). El pH es el indicador primario de un proceso de descomposición, porque cuando existe contaminación por microorganismos tiende a aumentar. Sin embargo, un ligero aumento en el pH no necesariamente indica un deterioro por microorganismos, puesto que existen procesos químicos y/o bioquímicos de desaminación que producen

According to Raa and Gildberg (1982) and Hansen (1981), when the initial mixture is not sufficiently homogeneous extreme microenvironments occur, that is, zones where the pH is either very high or very low. The pH recorded in the three treatments (table 3), after mixing the silages for the taking of samples, indicates that there was good initial homogenization of the acids in all the silages, since during the 90 days of sampling they underwent minimum variations within the accepted pH values, according to Raa and Gildberg (1982). The pH is the main indicator of a decomposition process, because it tends to increase when there is contamination by microorganisms. However, a slight increase in pH does not necessarily indicate deterioration due to microorganisms, since chemical and/or biochemical deamination processes occur that liberate ammonia, thus affecting the pH (Gildberg, 1982).

The results of the multivariate statistical analysis, MANOVA, and the *a posteriori* Tukey test (Morrison, 1976; Steel and Torrie, 1988) for the pH in the three treatments, indicate significant differences between the AFC and ASA, and the IFC and ASA treatments ($p < 0.05$). Hence, it may be stated that the IFC treatment was the most stable, whereas the ASA silage presented most changes, besides being the most acidic (table 3). The use of acid mixtures containing citric acid can therefore be considered a good possibility for the preservation of silages, which coincides with Lo *et al.* (1993), as it provides good results and simplifies the preparation since it is an acid in solid form.

The production of water in the silages is mainly due to the liberation of water from the tissues, and reflects the degree of hydrolysis (Gildberg, 1982). The factors responsible for this hydrolysis are the endogenous enzymes of the fish and the pH obtained as a consequence of acid addition. Though the former is considered the principal factor (Backhoff, 1976; Gildberg, 1982; Raa *et al.*, 1983), the pH is also of great importance (Raa, 1980). It is known that meat subjected to low pH loses more water than at neutral pH (Daum-Thunberg *et al.*, 1992). In the treatments with phosphoric and citric acids (AFC and IFC), the initial pH were more basic than in the treatment with sulfuric and acetic acids (ASA), in which a higher percentage of initial liquid was observed than in the others

liberación de amonio y, por ende, afectan el pH (Gildberg, 1982).

El análisis estadístico multivariado, MANOVA, y la prueba *a posteriori* de Tukey (Morrison, 1976; Steel y Torrie, 1988), que se realizaron en los valores de pH de los tres tratamientos, indicaron que hay diferencias significativas entre los tratamientos AFC y ASA, e IFC y ASA ($p < 0.05$). En este sentido, es posible afirmar que el tratamiento IFC fue el más estable, mientras que el ensilaje ASA fue el que más cambios presentó, además de ser el más ácido (tabla 3). Por tanto, es posible aseverar que el uso de mezclas de ácidos que contienen ácido cítrico ofrece una buena posibilidad para la conservación de ensilajes, lo cual coincide con Lo *et al*, (1993), pues además de proporcionar buenos resultados, simplifica su elaboración por tratarse de un ácido en forma sólida.

La producción de agua en los ensilajes se debe principalmente a la liberación de ésta de los tejidos, y refleja el grado de hidrólisis (Gildberg, 1982). Los factores responsables de dicha hidrólisis son las enzimas endógenas del pescado y el pH obtenido a consecuencia de los ácidos añadidos. Si bien el primer factor es considerado como el principal (Backhoff, 1976; Gildberg, 1982; Raa *et al*, 1983), el pH es también de suma importancia (Raa, 1980). Se sabe que una carne sometida a pH bajo tiene mayor pérdida de agua que con pH neutral (Daum-Thunberg *et al*, 1992). En los tratamientos con ácidos fosfórico y cítrico (AFC e IFC) los pH iniciales fueron más básicos que en el tratamiento con ácidos sulfúrico y acético (ASA), donde se observó mayor porcentaje de líquido inicial que en los otros (Fig. 1), lo que coincide con las observaciones de Daum-Thunberg *et al* (1992). Sin embargo, a partir del día 20 de almacenamiento, el incremento en el porcentaje de líquido del tratamiento AFC fue mayor que el de ASA (Fig. 1). Con un pH de 3.4, proporcionado por los ácidos fosfórico y cítrico, el proceso de licuefacción quizás esté dado por la actividad enzimática, más que por la acidez de la mezcla de ácidos. Las enzimas más activas en condiciones ácidas son las proteasas digestivas, del tipo de la pepsina, y ciertas enzimas lisosomales, como la catepsina D (Gildberg, 1982). La pepsina presenta un pH óptimo entre 3 y 4, cuando se utiliza hemoglobina como sustrato, mientras que en el pescado la tasa óptima de autólisis es con pH de 4 (Raa y Gildberg,

(Fig. 1); this coincides with the observations of Daum-Thunberg *et al*. (1992). However, after day 20 of storage, the increase in the percentage of liquid in AFC was greater than that in ASA (Fig. 1). At pH 3.4, provided by the phosphoric and citric acids, liquefaction may be caused by enzymatic activity rather than by the acidity of the acid mixture. The most active enzymes in acidic conditions are the digestive protease, like pepsin, and certain lysosomal enzymes, such as cathepsin D (Gildberg, 1982). Pepsin presents an optimum pH between 3 and 4 when haemoglobin is used as substrate, while in fish the optimum rate of autolysis is at pH 4 (Raa and Gildberg, 1982). According to the above, a pH of 3.4 to 3.8 (beginning and end of AFC, respectively) favoured the rate of autolysis, whereas in the ASA treatment, with a more acidic pH, enzymatic activity tended to be lower than in AFC after day 20 (table 3; Fig. 2).

At the beginning, the preheated fish used in the IFC treatment had 1% of liquid, similar to the raw fish. However, on adding phosphoric and citric acids, the change in the percentage of liquid was greater in IFC (from 1 to 41.2%) than in AFC (from 1 to 24.3%). This difference between the two treatments may have been due to the preheating of the raw material for the IFC treatment. It is known that the heating of muscular fibres causes changes in their structure, especially when the material has a neutral pH (Gildberg, 1982), as occurred in this experiment (table 2). Neucere and Cherry (1982) established that solubility is the most obvious evidence of the structural changes that occur in the proteins on being subjected to a heat treatment. This is caused by the unfolding of the protein chains, which results in precipitation reactions, changes that are promoted under humid conditions.

In the IFC treatment, there were no significant changes in all the parameters analysed during the storage period, in contrast to the AFC and ASA treatments. The reason for this stability may be that, as a consequence of preheating, enzymatic activity was reduced almost in its entirety (Fig. 2).

The concentration of soluble protein is an indication of enzymatic activity and, in general, of the degree of denaturation undergone by the proteins during the process and storage of the silages (Backhoff, 1976; Raa and Gildberg, 1982; Hardy *et al.*, 1983; Stone

1982). De acuerdo con lo anterior, un pH de 3.4 a 3.8 (inicio y final de AFC, respectivamente) favoreció la tasa de autólisis, mientras que en el tratamiento ASA, cuyo pH fue más ácido, la actividad enzimática tendió a ser menor que en el AFC, a partir del día 20 (tabla 3; Fig. 2).

Al inicio, el pescado precalentado destinado al IFC mostró 1% de líquido, de forma similar al crudo. Sin embargo, al adicionar los ácidos fosfórico y cítrico, en el ensilaje IFC hubo un cambio mayor en el porcentaje de líquido (de 1 a 41.2%) que en el AFC (de 1 a 24.3%). Esta diferencia entre los dos tratamientos pudo deberse al precalentamiento que la materia prima sufrió para el tratamiento IFC. Se sabe que el calentamiento de fibras musculares origina cambios en la estructura de éstas, sobre todo cuando la materia tiene un pH neutro (Gildberg, 1982) como ocurrió en este experimento (tabla 2). Neucere y Cherry (1982) establecen que la solubilidad es la evidencia más obvia de los cambios estructurales que ocurren en las proteínas al ser sometidas a un tratamiento de calor. Esto es causado por el desdoblamiento de las cadenas proteicas, que ocasiona reacciones diversas de precipitación, cambios que son favorecidos bajo calentamiento en presencia de humedad.

El tratamiento IFC no mostró cambios grandes durante el transcurso del almacenamiento, en todos los parámetros analizados, a diferencia de los tratamientos AFC y ASA. La causa de dicha estabilidad puede ser que la actividad enzimática se redujo casi en su totalidad (Fig. 2), a consecuencia del precalentamiento.

La concentración de proteína soluble es un reflejo de la actividad enzimática y, en general, del grado de desnaturalización que sufrieron las proteínas durante el proceso y almacenamiento de los ensilajes (Backoff, 1976; Raa y Gildberg, 1982; Hardy *et al.*, 1983; Stone *et al.*, 1989). Cerca del 80% de las proteínas se solubilizan después de una semana a temperatura ambiente (Tatterson y Windsor, 1973). En los tratamientos AFC y ASA (Fig. 3), se observa que la solubilización de las proteínas cesa entre los 15 y 20 días de ensilado, a una temperatura promedio de 24°C (tabla 3). Este resultado no concuerda con lo observado por Backhoff (1976), quien encontró que la solubilización de las proteínas en un ensilaje cesa antes de dos semanas de almace-

et al., 1989). Almost 80% of the proteins solubilize after one week at ambient temperature (Tatterson and Windsor, 1973). It can be seen in the AFC and ASA treatments (Fig. 3) that solubilization of the proteins ceases between 15 and 20 days after ensiling, at a mean temperature of 24°C (table 3). This result does not concur with that obtained by Backhoff (1976), who found that solubilization of the proteins in a silage ceases before two weeks of storage, at a temperature of 21°C. Nevertheless, there are factors, such as high lipid content, that can reduce the solubility of proteins (Raa and Gildberg, 1982), which could have occurred in this study, since the silages were prepared with mackerel containing 14.7% of fat (table 2). However, in this study, significant differences were obtained between the three treatments ($p < 0.05$): IFC presented the lowest values, since its final soluble protein concentration corresponded to that recorded at time zero in ASA and to that of day 7 in AFC; similar behaviours were observed with regard to the amount of free amino acids (Figs. 4, 5). Therefore, it is possible to assume that the heating process, on achieving a reduction in enzymatic activity, yielded a lower concentration of soluble protein and free amino acids, implying less hydrolyzation of the proteins in the silage.

There were no changes in pH in any of the experimental treatments (table 2), indicating that there was no growth of bacteria. However, the amount of TMA increased in the three treatments after day 60 (Fig. 6). Though the final values increased during the last 30 days of storage, they did not reach the limits considered unsuitable for human consumption, *i.e.* 1,428.6 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ of fish (Pearson, 1971). In general, the production of TMA is attributed to the growth of bacteria due to the reduction in trimethylamine oxide (TMAO) (Raa *et al.*, 1983). Thus, its appearance in the silages where pH remains stable is difficult to explain. However, Haard (1992) established that there is a non-enzymatic mechanism for the demethylation of TMAO to TMA.

It can be assumed from the chemical analysis that there are differences in the amount of TVB between the three silages. However, in view of the great variability among them, in three replicas, this difference could not be detected, so it is not possible to conclude that these differences exist. Based

namiento, a una temperatura de 21°C. No obstante, existen factores, como un alto contenido de lípidos, que pueden reducir la solubilización de éstas (Raa y Gildberg, 1982), lo cual pudo haber ocurrido en el presente trabajo, ya que los ensilajes se elaboraron con macarela que contenía 14.7 % de grasa cruda (tabla 2). Sin embargo, en esta investigación se obtuvieron diferencias significativas entre los tres tratamientos ($p < 0.05$): el de IFC presentó los valores más bajos, ya que su concentración final de proteína soluble correspondió a la registrada en el tiempo cero en el ASA y a la del día 7 en el AFC, y, respecto a la cantidad de aminoácidos libres, se observaron comportamientos similares (Figs. 4 y 5). Por lo anterior, es posible suponer que el proceso de calentamiento, al lograr una reducción en la actividad enzimática, dio como resultado menor concentración de proteína soluble y aminoácidos libres, lo cual implica menor hidrolización de las proteínas presentes en el ensilaje.

En ninguno de los tratamientos experimentales hubo cambio en el pH (tabla 2), lo cual es indicio de que no hubo crecimiento de bacterias; sin embargo, la cantidad de TMA se incrementó en los tres tratamientos a partir del día 60 (Fig. 6). Si bien los valores finales aumentaron en los últimos 30 días de almacenamiento, éstos no alcanzaron los límites considerados como no aptos para el consumo humano, que son de 1,428.6 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ de pescado (Pearson, 1971). Por lo general, la producción de TMA es atribuida al crecimiento de bacterias debido a la reducción del óxido de trimetilamina (TMAO) (Raa *et al.*, 1983). Bajo estos términos, su aparición en los ensilajes donde el pH permanece estable es difícil de explicar. Sin embargo, Haard (1992) establece que existe un mecanismo no enzimático para la dimetilación del TMAO en TMA.

El análisis químico hace suponer que existen diferencias en la cantidad de BVT, entre los tres ensilajes. Sin embargo, debido a la gran variabilidad entre ellos, para tres réplicas, esta diferencia pudo ser encubierta, por lo que no es posible concluir que existen dichas diferencias. Con base en esta discusión, se puede decir que hay una baja potencia de prueba en la estadística de los resultados (altos valores de probabilidad de cometer el error tipo II). La gran variabilidad presentada es seguramente un reflejo del inicio del proceso de deterioración, en el que la tasa de forma-

on this discussion, it may be stated that there is low power in the statistics of the results (high probability values of committing the type II error). The great variability observed probably indicates the beginning of a decomposition process, in which the rate of TVB formation, including TMA and ammonia, increases at different speed, even among the same replicas of the three treatments. Therefore, it is necessary to observe more carefully the preservation of a silage prepared under these conditions, after 60 days.

Temperature plays an important role in the conservation of the silages and accelerates the liquefaction process. Though a silage may remain stable for up to two years at room temperature (20°C), a shorter storage time has been determined for tropical temperatures (Raa *et al.*, 1983). In this study, the silages were stored where ambient temperature reached high levels after day 40 (30°C), with a maximum on day 60 (35°C; table 2). Though the TVB levels obtained do not indicate decomposition, their increase after day 60 can be attributed to the high temperature recorded (Raa *et al.*, 1983) and not to bacterial activity, since the pH remained sufficiently low so as not to allow bacterial activity to begin. The increase of ammonia in the silages, product of a deamination process, results in a decrease in protein nitrogen and, consequently, in a decrease of the nutritional value. Therefore, the storage temperature must be monitored in order to maintain the nutritional value.

CONCLUSIONS

The mixture of citric and phosphoric acids offers a good alternative for the preparation of silages from fishery subproducts. With it, by heating prior to the ensiling process, a good preservation of the product is achieved and the percentage of liquid and soluble protein decrease.

The following can be stated regarding the treatments:

- The preheated raw material of the IFC treatment reduced enzymatic activity, resulting in a lower percentage of liquid, 15% less than in the conventional ASA silage and 20% less than in AFC. Moreover, the IFC treatment resulted in lower amounts of soluble protein and free amino acids.

ción de BVT, incluyendo TMA y amonio, se incrementa a diferente velocidad, aun entre las mismas réplicas de los tres tratamientos. Por tal motivo, será necesario observar más cuidadosamente la conservación de un ensilaje elaborado bajo estas condiciones, después de 60 días.

La temperatura juega un papel importante en la conservación de los ensilajes y acelera el proceso de licuefacción. Aunque, un ensilaje puede permanecer estable hasta dos años en condiciones de temperatura ambiente (20°C), para temperaturas tropicales se ha determinado un tiempo de anaquel menor (Raa *et al.*, 1983). En este trabajo, los ensilajes fueron almacenados donde la temperatura ambiente alcanzó niveles altos a partir del día 40 (30°C) y llegó al máximo el día 60 (35°C, tabla 2). Aun cuando los niveles de BVT obtenidos no indican descomposición, su aumento a partir del día 60 puede atribuirse a la alta temperatura registrada (Raa *et al.* 1983) y no a la actividad bacteriana, ya que el pH se mantuvo lo suficientemente bajo como para no dar inicio a actividad bacteriana. De cualquier manera, el aumento de amonio en los ensilajes producto de un proceso de desaminación trae como consecuencia una disminución del nitrógeno proteico, y por ende, una disminución del valor nutricional; por tanto, se recomienda que se vigile la temperatura de almacenamiento para mantener el valor alimenticio.

CONCLUSIONES

La mezcla de ácidos cítrico y fosfórico ofrece una buena alternativa para elaborar ensilajes a partir de subproductos pesqueros. Con ella, efectuando un calentamiento previo al proceso de ensilaje, se logra buena conservación del producto y se disminuye el porcentaje de líquido y proteína soluble.

Respecto a los tratamientos realizados puede afirmarse lo siguiente:

- La materia prima precalentada del tratamiento IFC ocasionó la reducción de la actividad enzimática, lo cual se reflejó en un menor porcentaje de líquido, 15% menos que en el ensilaje convencional ASA y 20% menos que en el AFC. A su vez, el tratamiento IFC dio lugar a menores cantidades de proteína soluble y aminoácidos libres.

- The storage temperature of the silages must be controlled, because an increase in temperature reduces the nutritional quality since ammonia is generated as a result of the deamination of free amino acids.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by SEP, DIGICSA, through grant No. 91-01-02-001-648, and by CONACYT, through grant No. 237 A 9107. We thank TECMAR, S.A. de C.V., for providing the raw material.

English translation by Christine Harris.

- La temperatura de almacenamiento de los ensilajes debe ser controlada, ya que el aumento de ésta reduce la calidad nutricional, al generar amonio a partir de la desaminación de los aminoácidos libres.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero otorgado por SEP, DIGICSA, a través del convenio No. 91-01-02-001-648, y el apoyo en infraestructura proporcionado por CONACYT, con el convenio No. 237 A 9107. TECMAR, S.A. de C.V., proporcionó generosamente la materia prima.

REFERENCIAS

- Åsgård, T. and Austreng, E. (1986). Blood ensiled or frozen, a feed for salmonids. *Aquaculture*, 55: 263-284.
- Backhoff, H.P. (1976). Some chemical changes in fish silage. *J. Food Technol.*, 11: 353-363.
- Barret, A.J. (1972). Lysosomal enzymes. In: J.T. Dingle (ed.), *Lysozymes - A Laboratory Handbook*. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, pp. 46-135.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917.
- Chan, J.K., Gill, T.A. and Paulson, A.T. (1992). Cross-linking of myosin heavy chains from cod, herring and silver hake during thermal setting. *J. Food Sci.*, 57(4): 906-912.

- Conway, E.J. and Byrne, A. (1933). LXI. An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. 1. The micro-determination of ammonia. *Biochem. J.*, 27: 419-429.
- Daum-Thunberg, D.L., Foegeding, E.A. and Ball Jr., H.R. (1992). Rheological and water-holding properties of comminuted turkey breast and thigh: Effects of initial pH. *J. Food Sci.*, 57(2): 333-337.
- Gildberg, A. (1982). Autolysis of fish tissue: General aspects. Ph.D thesis, **University of Tromsø**, Norway, 112 pp.
- Haard, N.F. (1992). Biochemical reaction in fish muscle during frozen storage. In: E.G. Bligh (ed.), **Seafood Science and Technology**. Fishing News Books, pp. 176-209.
- Hansen, F.R. (1981). Ensilert Rekeavfall som for til Laksefisk og som råstoff til Kitosanproduksjon. Kandidatoppgave i Fiskerifag. Norgesfiskerihogskole, **Universitetet i Tromsø**, Norge, 75 pp.
- Hardy, R.W., Shearer, K.D., Stone, F.E. and Wieg, D.H. (1983). Fish silage in aquaculture diets. *J. World Mariculture Soc.*, 14: 695-703.
- Lo, K.V., Liao, P.H. and Bullock, C. (1993). Silage production from salmon farm mortalities. *Aquacultural Engineering*, 12: 37-45.
- Lowry, O.U., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randal, P.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Morrison, D.F. (1976). **Multivariate Statistical Methods**, 2nd Ed. McGraw-Hill Int. Book Co., 415 pp.
- Neave, V.H. (1986). **Introducción a la tecnología de productos pesqueros**. CECSA, México, 470 pp.
- Neucere, J.N. and Cherry, J.P. (1982). Structural changes and metabolism of protein following heat denaturation. In: J.P. Cherry (ed.), **Food Protein Deterioration. Mechanisms and Functionality**. American Chemical Soc., pp. 135-161.
- Pearson, D. (1971). **The Chemical Analysis of Foods**, 6th Ed. Chemical Publishing Co., 604 pp.
- Raa, J. (1980). Utilization of fish by-catch fish on shrimp trawlers. **Report to FAO** (Fisheries Department), based on a visit to Thailand and Malaysia during September 1980, 30 pp.
- Raa, J. and Gildberg, A. (1982). Fish silage: A review. In: **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 116: 343-419.
- Raa, J., Gildberg, A. and Strom, T. (1983). Silage production - theory and practice. In: D.A. Leward, A.V. Taylor and R.A. Lawrie (eds.), **Upgrading Waste for Feeds and Food**. Butterworths, U.K., 8: 117-132.
- Sikorski, Z.E., Scott, D.N. and Buisson, D.H. (1984). The role of collagen in the quality and processing of fish. In: **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 20(4): 301-343.
- Steel, R.G. y Torrie, J.H. (1988). **Bioestadística: Principios y procedimientos**, 2ª ed. McGraw Hill, 622 pp.
- Stone, F.E. and Hardy, R.W. (1986). Nutritional value of acid stabilised silage and liquefied fish protein. *J. Sci. Food Agric.*, 37: 797-803.
- Stone, F.E., Hardy, R.W., Shearer, K.D. and Scott, T.M. (1989). Utilization of fish silage by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 76: 109-118.
- Tatterson, I. and Windsor, M.L. (1973). Torry tests practical value of fish silage. **Developments in Processing**, No. 443. Torry Research Station. Fish Mark. Procc. Packag, U.K.
- Windsor, M. y Barlow, S. (1984). **Introducción a los subproductos de pesquería**. Traducido, título original: Introduction to fishery by-products. Ed. Acribia, España, 204 pp.