

Aprovechamiento de recursos pesqueros infrautilizados para la obtención de alimentos mejorados para el cultivo de peces

G. Aurrekoetxea y M. N. Perera

Fundación AZTI. Instituto Tecnológico Pesquero y Alimentario. Departamento Tecnología de los Alimentos. Txatxarramendi Ugarteza z/g. E-48395 Sukarrieta (Vizcaya), España. Correo electrónico: gaur@suk.azti.es

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

RESUMEN

Se caracterizaron varios recursos pesqueros infrautilizados (especies de bajo interés, residuos de la industria transformadora...) seleccionando uno de ellos según su composición, volumen y disponibilidad para la obtención de proteína de alta calidad apta para dietas de alevines de dorada o rodaballo. Como tecnología de extracción se empleó la hidrólisis enzimática, cuyas condiciones de proceso permiten obtener un producto final de alto valor nutritivo. Se ensayaron cuatro enzimas comerciales determinando su actividad y se seleccionó aquella de mejor relación actividad/coste. Finalmente, se optimizaron las condiciones de obtención del hidrolizado y se comparó la digestibilidad in vitro de la proteína obtenida con la de un producto no tratado.

Palabras clave: Proteína de pescado, hidrolizado, digestibilidad, harina de pescado, enzimas.

ABSTRACT

Recovery of underutilised fishery resources to improve fish meal for aquaculture

Several underutilised fishery resources were analysed, including low market value species and fish processing byproducts, and then one was selected due to its composition, amount and availability for high quality protein production for juvenile gilthead sea bream and turbot diets. Among the available extraction technologies, enzymatic hydrolysis was selected, since the resulting final product has high nutritional value. Four commercial enzymes were tested to determine their activity, and the one with the best activity/cost relationship was chosen. Finally, the conditions for hydrolysate production were optimised, and in vitro digestibility of the protein obtained was compared with that of an untreated product.

Keywords: Fish protein, hydrolysate, digestibility, fish meal, enzymes.

INTRODUCCIÓN

La extensa línea costera con la que cuenta nuestro país, junto con la alta tasa de consumo de pescado y la progresiva reducción de capturas por nuestra flota, le otorgan un alto potencial para la acuicultura. La industria de la piscicultura marina

se caracteriza por un desarrollo espectacular durante los últimos diez años. En 1998 la producción de peces marinos alcanzó las 11 296 t, siendo la dorada *Sparus auratus* Linnaeus, 1758 la especie predominante (6 330 t) seguida del rodaballo *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758) (1 850 t) (Basurco y Larrazábal, 1999).

El objetivo de este trabajo es obtener proteína de alta calidad a partir de recursos infrautilizados para incluirla en piensos de acuicultura. En concreto, se parte de un producto de bajo valor añadido, como es la harina de pescado obtenida a partir de residuos de la industria transformadora, y se introduce la hidrólisis enzimática en el proceso de producción con lo que aumentaría su calidad nutricional (digestibilidad).

En este sentido, uno de los aspectos más importantes en la producción de peces de acuicultura es su alimentación, tanto desde el punto de vista de los costes, como de la influencia en la calidad del producto. Concretamente, el componente más crucial es la proteína. Representa el ingrediente más caro de los piensos y su excreción es responsable de la sobrecarga de nitrógeno del medio ambiente. Por tanto, mejorando la digestibilidad de la proteína se contribuye a una mejora del rendimiento de los peces y a una reducción del coste de producción y del impacto de la piscicultura sobre el medio ambiente.

Por otra parte, para la obtención de proteína se plantea el aprovechamiento de recursos pesqueros infrautilizados (subproductos de la pesca, etc.) lo que permitiría reducir el esfuerzo pesquero al mejorar la utilización de las materias primas pesqueras.

Existen diferentes estrategias para recuperar la proteína del pescado. Por un lado, se encuentran los concentrados de proteína que se obtienen por purificación de la fracción proteica, eliminando en mayor o menor grado los demás componentes mediante desengrasado, secado, etc. Por otro, los hidrolizados de proteína, que se obtienen mediante tratamientos que solubilizan la proteína, liberando péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres que posteriormente son recuperados. En este tipo de aplicaciones, se opta por la hidrólisis debido a que este tratamiento da lugar a un producto final de mayor digestibilidad que la proteína no tratada (Bouchez y Azzi, 1991).

Una de las tecnologías más extendidas para la obtención de hidrolizados proteicos a partir de subproductos de la pesca es la hidrólisis enzimática, debido a las ventajas que presenta frente a los métodos químicos (Diniz y Martin, 1997). Así, se pueden encontrar referencias en la bibliografía de gran variedad de enzimas que se utilizan para estos fines partiendo de materias primas diferentes, como, por ejemplo, residuos de túnidos (Sampedro, López-Benito y Pastoriza, 1986; Raghunath, 1993), capelán *Mallotus villosus* (Müller, 1776) (Shahidi,

Han y Synowiecki, 1995), sardina *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792) (Quaglia y Orban, 1987), arenque *Clupea harengus* Linnaeus, 1758 (Hoyle y Merritt, 1994), subproductos del procesado de langostinos (Baek y Cadwallader, 1995), etcétera.

MATERIAL Y MÉTODOS

Caracterización y selección de la materia prima

Se identificaron y cuantificaron los principales recursos pesqueros potencialmente utilizables para la obtención de proteína, tomando como ámbito de referencia la Comunidad Autónoma del País Vasco. Entre ellos se consideraron la sardina, los residuos de la industria conservera de túnidos, la caballa, *Scomber scombrus* Linnaeus, 1758, el estornino o mackarel, *Scomber japonicus* Houttuyn, 1782, y la bacaladilla, perlita o lirio, *Micromesistius poutassou* (Risso, 1826). Se seleccionó el más adecuado teniendo en cuenta su composición fisicoquímica, volumen generado, disponibilidad y grado de aprovechamiento actual.

Selección de enzimas

Se preseleccionaron cuatro enzimas comerciales con el objetivo de evaluar su actividad enzimática y poder seleccionar aquella de mayor eficacia, entendida como la mayor relación actividad/coste, para utilizarla en la obtención del hidrolizado de proteína. La preselección se realizó en función del tipo de actividad (endoproteasa), ésta se obtuvo de referencias bibliográficas conocidas sobre aplicaciones similares y de recomendaciones de los propios fabricantes. Las enzimas preseleccionadas fueron: Bioproteasa LA450 (Gygyc Biocon), Delvolase (Gist-Brocades), Novozym FM 2,0L y Alcalase 2,4L (Novo Nordisk).

La actividad proteolítica se determinó sobre la materia prima seleccionada para cada una de las enzimas, a 55 °C y 0,2 % de la solución de la enzima, mediante la determinación del nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA) 0,3 M, según el método de Baek y Cadwallader (1995). Además, se realizó un seguimiento de la reacción a lo largo del tiempo (3 h) para tres concentraciones de enzima (0,2 %, 0,5 % y 1,0 %) mediante la determinación del grado de hidrólisis (Baek y Cadwallader, 1995).

Obtención del hidrolizado proteico

Materia prima

Para la obtención del hidrolizado de proteína se seleccionaron los residuos cocidos de túnidos destinados a la elaboración de harinas de pescado (piel, colas, espinas y migas).

Procedimiento

Consiste básicamente en aplicar sobre la materia prima la enzima seleccionada en las condiciones óptimas de tiempo y concentración. Se ensayaron diferentes concentraciones de la enzima seleccionada, 1 %, 3 % y 5 % para determinar la concentración óptima con la que se logra el grado de hidrólisis deseado en el producto final. Finalizada la reacción, se toma 1 g de muestra, para la determinación del grado de hidrólisis, y se procede al secado en estufa a vacío a una temperatura de 90 °C. Por último, el hidrolizado seco se muele para obtener un polvo de un tamaño máximo de partícula de 2 mm.

Métodos analíticos

Los hidrolizados proteicos resultantes se caracterizan mediante el análisis del contenido en proteínas por el método Kjeldahl (Cunniff, 1995); la medida del grado de hidrólisis por el método de Baek y Cadwallader (1995); y la determinación de la digestibilidad *in vitro* mediante el procedimiento multienzimático pH estable (Pedersen y Eggum, 1983).

Aumento del porcentaje de proteína en el producto. Ensayo de cribado

Se evaluó la eficacia de tres mallas de diferente luz (0,5 cm, 1 cm y 2 cm) con el objetivo de incrementar el porcentaje de proteína en la harina de pescado eliminando las espinas en diferente proporción antes del molido final. Se toman lotes de 2 kg y se realiza la operación de cribado por triplicado para cada uno de los tamices. Se recogen las dos fracciones resultantes de la separación y se anotan sus pesos para calcular el rendimiento de la operación de cribado y estudiar la relación existen-

te entre el porcentaje de espinas retenido por la criba y el contenido en proteína sobre extracto seco (PSES) de la harina sin espinas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo de actividad enzimática

Las posibilidades que se presentan a la hora de elegir una enzima para la obtención de un hidrolizado de proteína de pescado son múltiples. Existe una gran variedad de enzimas según atendamos a su origen, tipo de reacción catalizada, naturaleza del centro catalítico, especificidad de sustrato, etc., pero para este tipo de aplicaciones lo más adecuado consiste en la aplicación de enzimas proteasas con las siguientes características:

- Origen microbiano, frente a las de origen vegetal o animal, por su mayor estabilidad frente a la temperatura y el pH, mayor rendimiento y menor coste de producción (Rao *et al.*, 1998).
- pH óptimo básico, ya que estas proteasas presentan una mayor actividad que las neutras (Baca, Peña-Vera y Díaz-Castañeda, 1991; Baek y Cadwallader, 1995).
- Actividad endoproteasa, de manera que sean los enlaces peptídicos internos los susceptibles de ser hidrolizados dando lugar a péptidos de diferentes tamaños.

Las cuatro enzimas ensayadas cumplen estos requisitos. La actividad enzimática para cada una de las cuatro enzimas ensayadas se determinó mediante la lectura de absorbancia que produce el nitrógeno soluble en TCA 0,3 M, liberado como producto de la actividad proteolítica de la enzima correspondiente sobre la materia prima en las condiciones de ensayo establecidas. Los valores de actividad enzimática y la relación actividad/coste obtenidos para cada una de las enzimas ensayadas se presentan en la tabla I.

Tal como puede observarse, los valores de actividad obtenidos son similares para las cuatro enzimas ensayadas, siendo el más elevado el conseguido con Delvolase, aunque cualquiera de ellos sería adecuado para la aplicación propuesta. De todas formas, atendiendo al criterio establecido, se seleccionó la enzima para la que la relación actividad proteolítica/coste fue mayor. Así, la enzima seleccionada para su empleo en la obtención de los

Tabla I. Actividad enzimática y relación actividad/coste de las enzimas ensayadas. (U): mg N soluble en TCA 0,3M/min/g MP.

Enzima	Coste (PTA/g) (€/g)	Actividad enzimática (U/g)	Actividad/coste (U/PTA) (U/€)
Bioproteasa LA450	2 700 (16,23)	14,583	5,40 (0,032)
Delvolase	3 115 (18,72)	15,800	5,07 (0,030)
Novozym FM2,0L	2 800 (16,83)	13,432	4,79 (0,029)
Alcalase 2,4L	4 000 (24,04)	15,504	3,88 (0,023)

hidrolizados de proteína fue Bioproteasa LA450 (Gygc Biocon).

Determinación del tiempo óptimo de hidrólisis

El estudio del desarrollo de la reacción a lo largo del tiempo para cada una de las cuatro enzimas seleccionadas permitió conocer cómo evolucionaba el grado de hidrólisis a lo largo de tres horas de reacción. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 1, 2, 3 y 4.

El comportamiento observado para cada una de las cuatro enzimas en las diferentes concentraciones sigue una pauta similar. Se observa un primer tramo de máxima pendiente entre los 0 y 10 min, en el cual se produce el incremento de grado de hidrólisis más fuerte, y a partir de ese momento el grado de hidrólisis sigue aumentando pero en menor grado, es decir, la liberación de nitrógeno soluble en TCA 0,3 M se produce de forma más lenta.

Por otro lado, el tiempo de hidrólisis óptimo se determinó considerando el intervalo mínimo ne-

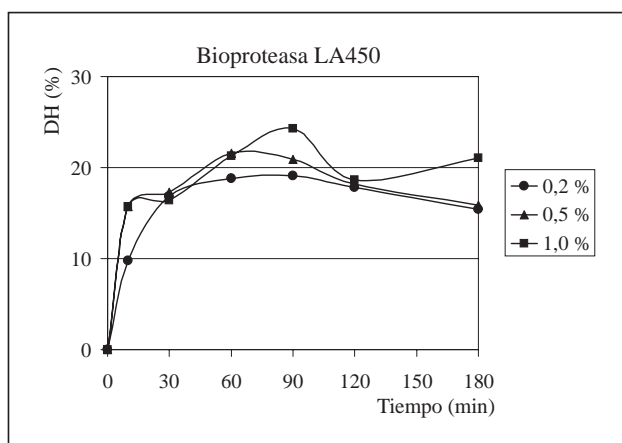


Figura 1. Evolución del grado de hidrólisis (DH) para tres concentraciones de Bioproteasa LA450 (Gygc Biocon).

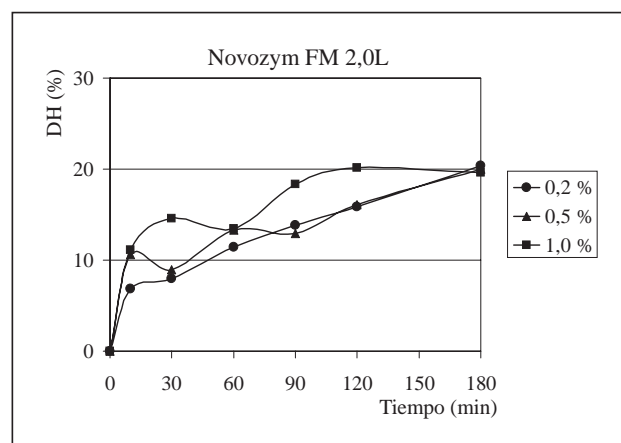


Figura 3. Evolución del grado de hidrólisis (DH) para tres concentraciones de Novozym FM 2,0L (Novo Nordisk).

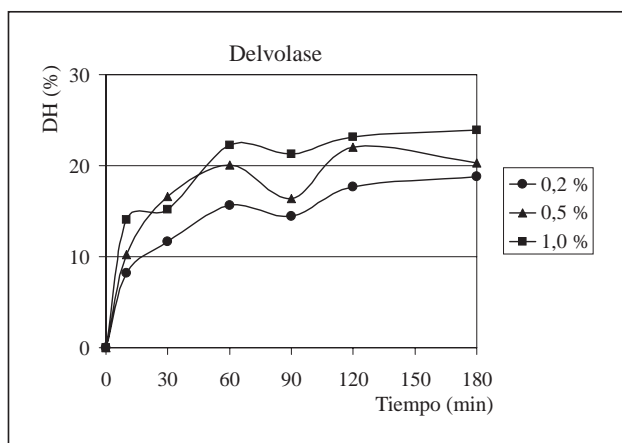


Figura 2. Evolución del grado de hidrólisis (DH) para tres concentraciones de Delvolase (Gist-Brocades).

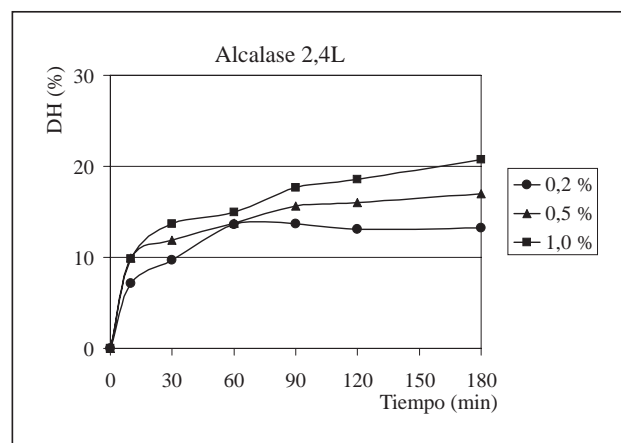


Figura 4. Evolución del grado de hidrólisis (DH) para tres concentraciones de Alcalase 2,4L (Novo Nordisk).

cesario para obtener el máximo grado de hidrólisis. En el caso de la enzima seleccionada (Bioproteasa LA450) el mayor grado de hidrólisis se logra durante los primeros 30 min de reacción. Posteriormente, el grado de hidrólisis continúa aumentando, pero más lentamente. El conseguir un grado de hidrólisis elevado en un periodo de tiempo relativamente corto es de gran interés ya que facilita la aplicación de la operación a escala industrial y la fabricación en régimen continuo.

Optimización de la concentración de la enzima

En cuanto al ensayo de diferentes concentraciones de enzima (Bioproteasa LA450), 1 %, 3 % y 5 %, los grados de hidrólisis conseguidos fueron los que se recogen en la tabla II. Además del grado de hidrólisis también se recogen los resultados obtenidos para el contenido proteico y digestibilidad *in vitro*, variables establecidas para caracterizar los hidrolizados de proteína.

Atendiendo a los resultados, la concentración de enzima seleccionada fue la del 5 % para la que se consigue aproximadamente un grado de hidrólisis del 35 %, ya que se sabe que los alevines de peces necesitan un aporte de nutrientes altamente asimilables que se pueden conseguir, por ejemplo, con la pre-digestión de las proteínas mediante hidrólisis enzimática (Masakata, 1996; Wee, 1992).

Por otra parte, de la medida de digestibilidad se desprende que los hidrolizados no presentan una digestibilidad mayor que la materia prima no tratada. Este hecho puede deberse al propio método de medida de la digestibilidad. El método multienzimático se basa en digerir la harina en una solución de tres enzimas y en estimar la digestibilidad *in vitro* mediante la determinación de la cantidad de NaOH necesaria para mantener el pH en 8, es decir, los hidrógenos desprendidos al romperse los enlaces de hidrógeno intramoleculares de las pro-

teínas. Como las muestras a analizar ya estaban parcialmente hidrolizadas (es decir, rotos muchos de estos enlaces), es normal que desprendan menor cantidad de hidrógeno que una muestra no hidrolizada, por lo que, según este método, su digestibilidad sería menor.

Por tanto, el método multienzimático no resulta adecuado para determinar la digestibilidad *in vitro* de muestras ya hidrolizadas. A menudo las medidas de digestibilidad *in vitro* no se corresponden con el valor real en caso de realizar el ensayo *in vivo*. Así, Clancy *et al.* (1995) comprobaron que, a pesar de que la digestibilidad puede evaluarse por diferentes análisis *in vitro*, las medidas resultantes de estos no proporcionan valores que permitan predecir la digestibilidad *in vivo* de la proteína ensayada. El ensayo de la digestibilidad *in vivo* se hace, pues, imprescindible.

Finalmente se estableció el procedimiento para la obtención del hidrolizado de proteína con la enzima, condiciones de tiempo, concentración de temperatura y pH óptimos, tal como se representa en la figura 5.

Optimización de la operación de cribado

Los resultados de rendimiento obtenidos para el ensayo de las diferentes cribas se presentan en la tabla III.

A partir de los rendimientos obtenidos se obtuvo una función cuadrática, que relaciona el porcentaje de cribado de espinas con la cantidad de proteína presente en el producto final, mediante una estimación por mínimos cuadrados ordinarios de la serie en logaritmos. De esta forma se obtuvo la función recogida en la figura 6, en la que se puede observar que a medida que aumenta el porcentaje de espinas retirado aumenta el porcentaje de proteína en la harina hasta un máximo a partir del cual empieza a descender. Este descenso probablemente es

Tabla II. Grado de hidrólisis, contenido proteico y digestibilidad *in vitro* para cada porcentaje de enzima ensayada. (PSES): proteína sobre extracto seco.

	Bioproteasa LA450 1 %	Bioproteasa LA450 3 %	Bioproteasa LA450 5 %	Harina de pescado (sin hidrolizar)
Grado de hidrólisis (%)	10,37	24,33	34,58	0
Proteína (%)	35,6	31,6	31,3	50,5
Humedad (%)	31,0	36,7	34,8	9,8
PSES (%)	51,5	49,9	48,1	56,0
Digestibilidad (%)	82,9	82,4	82,0	83,9

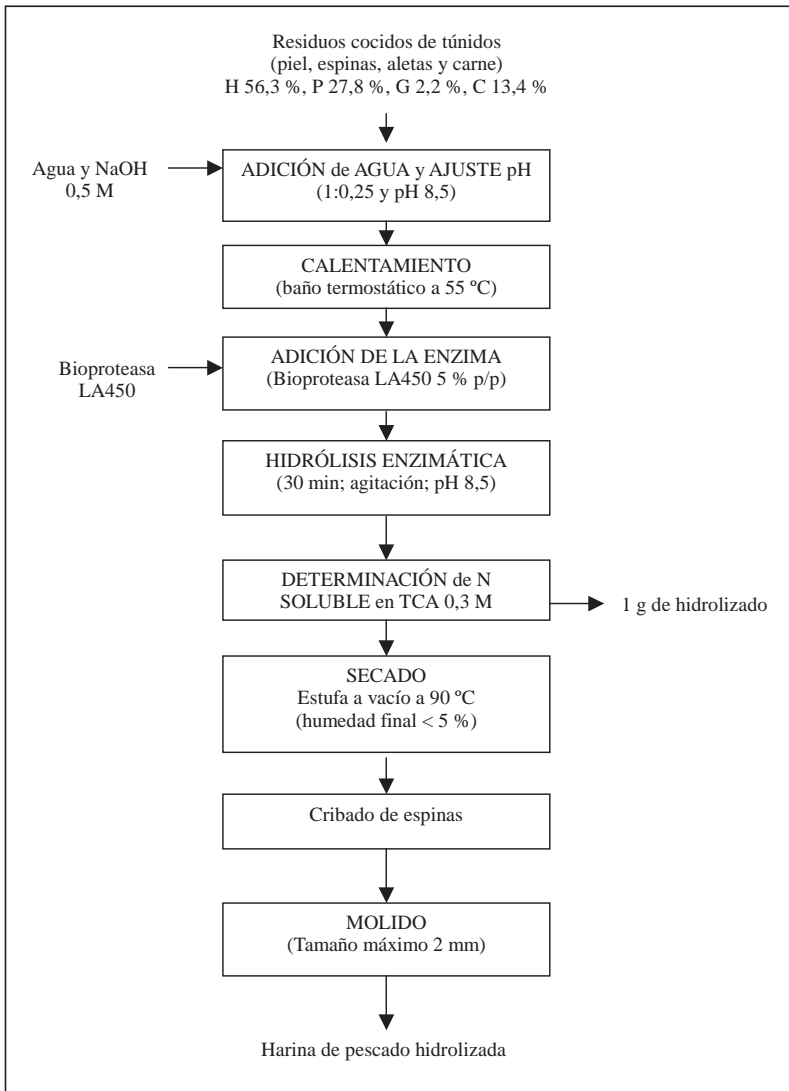


Figura 5. Procedimiento y condiciones de reacción para la obtención del hidrolizado de proteína.

debido a que la separación de espinas conlleva también una retirada de las proteínas que constituyen el hueso. Por tanto, el porcentaje óptimo de retirada de espinas sería, aproximadamente, del 15 %.

Con este porcentaje se logra un aumento del contenido en proteína (SES) del 5 %, es decir, se pasa de una harina de pescado con el 58,5 % en proteína (SES) a otra con aproximadamente el 64 %, con

Tabla III. Rendimiento obtenido en el ensayo de cribado. (Rendimiento): (peso de harina cribada/peso de harina sin cribar) × 100. (PSES): proteína sobre extracto seco en la harina obtenida.

Criba de malla	Rendimiento (%)	PSES (%)
Luz 0,5 cm	75,69	64,43
	76,60	63,10
	75,38	64,74
Luz 1 cm	80,22	61,98
	81,60	63,15
	76,28	52,68
Luz 2 cm	86,76	58,24
	85,54	61,43
	88,77	62,25

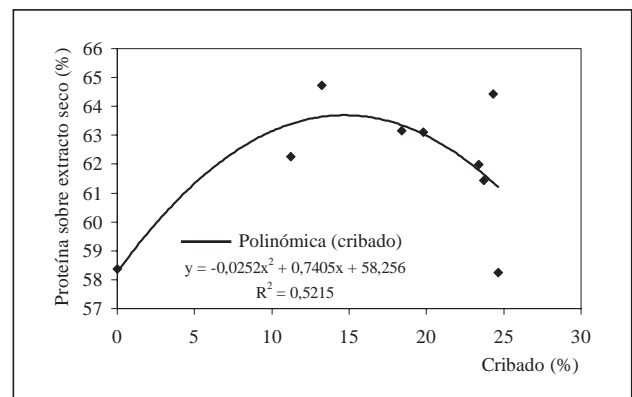


Figura 6. Efecto del cribado de espinas sobre el aumento de proteína en la harina de pescado.

la consiguiente revalorización de la harina de pescado de partida. Por tanto, habría que recurrir a la criba de 2 cm para eliminar espinas en un 15 % ya que con ella se consigue incrementar un 5 % el contenido de proteína (SES) aunque a costa de reducir el rendimiento de producción un 15 %.

CONCLUSIONES

La enzima seleccionada para la obtención del hidrolizado fue Bipteasa LA450, y los óptimos de concentración de la enzima y el tiempo de reacción (para conseguir un producto con un 35 % de grado de hidrólisis) fueron el 5 % y 30 minutos, respectivamente. En estas condiciones se verificó que el procedimiento propuesto es válido para la obtención de dicho hidrolizado de proteína. Por otra parte, el ensayo de digestibilidad *in vitro* mediante el método multienzimático no resultó adecuado para medir la digestibilidad de las muestras parcialmente hidrolizadas, lo que hace necesario estudiar otras formas de relacionar la hidrólisis proteica con una mejor asimilabilidad de este componente, por ejemplo, mediante la determinación de la digestibilidad péptica (Clancy *et al.*, 1995). De todas formas, es necesario llevar a cabo el estudio de la digestibilidad *in vivo* para este producto mediante un ensayo de alimentación con alevines de dorada o de rodaballo. Finalmente, la eliminación de espinas en la proporción adecuada permite obtener una harina de pescado con un contenido en proteína sobre extracto seco superior al 60 %, lo que proporciona un valor añadido al producto de partida.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Departamento de Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco el apoyo y financiación recibidos para la realización de este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

Baca, D. R., M. T. Peña-Vera y M. Díaz-Castañeda. 1991. Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases: Yield and nutritional value. *Journal of Food Science* 56 (2): 309-314.

- Baek, H. H. y K. R. Cadwallader. 1995. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. *Journal of Food Science* 60 (5): 929-935.
- Basurco, B. y G. Larrazábal. 1999. Situación actual de la piscicultura marina en España. *Productos del Mar* mayo-junio: 97-104.
- Bouchez, P. y D. Azzi. 1991. Biotechnology: Use of hydrolytic enzymes in preprocessing of feedstuffs. En: *Nutritional Strategies and Aquaculture waste. Proceedings of the 1st International Symposium on Nutritional Strategies in Management of Aquaculture Waste*. C. B. Cowey y C. Y. Cho (eds.): 91-101. University of Guelph, Ontario, Canadá.
- Clancy, S., R. Beames, D. Higgs, B. Dosanjh, N. Haard y B. Toy. 1995. Influence of spoilage and processing temperature on the quality of marine fish protein sources for salmonids. *Aquaculture Nutrition* 1 (3): 169-177.
- Cunniff, P. (ed.). 1995. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16ª ed. Association of Official Analytical Chemists International. 2 vol. Arlington, Virginia, EE UU.
- Diniz, F. M. y A. M. Martin. 1997. Fish protein hydrolysates by enzymatic processing. *Agro-Food-Industry Hi-Tech* 8 (3): 9-13.
- Hoyle, N. T. y J. H. Merritt. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science* 59 (1): 76-79.
- Masataka, S. 1996. *Production of enzyme-treated fish-meal*. Patente nº: JP1995000091831.
- Pedersen, B. y B. O. Eggum. 1983. Prediction of protein digestibility by an *in vitro* pH-stat procedure. *Zeitschrift für Tierphysiologie, Tierernährung und Futtermittelkunde* 49: 266-277.
- Quaglia, G. B. y E. Orban. 1987. Enzymic solubilisation of proteins of sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases. *Journal of Science Food Agriculture* 38: 263-269.
- Raghunath, M. R. 1993. enzymatic protein hydrolysate from tuna canning wastes: Standardisation of hydrolysis parameters. *Fish. Technol. Soc.* 30 (1): 40-45.
- Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge y V. V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62 (3): 597-635.
- Sampedro, G., M. López-Benito y L. Pastoriza. 1986. Cabezas y vísceras de túnidos: Su aprovechamiento para alimentación animal. *Informes Técnicos del Instituto de Investigaciones Pesqueras* 137: 32 pp.
- Shahidi, F., X. Q. Han y J. Synowiecki. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry* 53 (3): 285-293.
- Wee, K. L. 1992. An overview of fish digestive physiology and the relevance to the formulation of artificial fish feeds. En: *Proceedings of the Aquaculture Nutrition Workshop* (15-17 de abril, 1991. Salamander Bay, Australia). G. L. Allan y W. Dall (eds.): 78-80. NSW-Fisheries, Brackish Water Fish Culture Research Station. Salamander Bay, Australia.