



# COMPARACIÓN DEL EFECTO DE DOS TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS CON ACTIVIDAD COLAGENASA Y UNA CENTRIFUGACIÓN COMPLEMENTARIA EN LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL AGUA DE COLA GENERADA POR LA INDUSTRIA SARDINERA

COMPARISON OF THE EFFECT OF TWO ENZYMATIC TREATMENTS WITH COLLAGENASE ACTIVITY AND A COMPLEMENTARY CENTRIFUGATION ON THE PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF FISHMEAL INDUSTRY STICKWATER

Ramón Pacheco-Aguilar<sup>1</sup>, Ana María Calderón de la Barca<sup>1</sup>, Francisco Javier Castillo-Yañez<sup>2</sup>, Enrique Márquez-Ríos<sup>3</sup>, Fernando Luis García-Carreño<sup>4</sup>, Santiago Valdez-Hurtado<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. P.O. Box 1735. Hermosillo, Sonora 83000, México.

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Encinas y Rosales s/n. Hermosillo, Sonora 83000, México.

<sup>3</sup> Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. Universidad de Sonora, Encinas y Rosales s/n. Hermosillo, Sonora, 83000. México.

<sup>4</sup> Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S. 23000, México.

<sup>5</sup> Universidad Estatal de Sonora - Unidad Académica Navojoa. Blvd. Manlio Fabio Beltrones 810, Col. Bugambillas, C.P. 85875

## RESUMEN

Se evaluó el efecto de las enzimas de vísceras de sardina Monterey en el tratamiento del agua de cola producida por sardinas crinuda y Monterey y, se compararon con enzimas de un extracto comercial. Además, se aplicó una centrifugación complementaria al ensayo. La enzima comercial tuvo mayor actividad proteasa que la enzima de víscera de sardina (0.65 U/mg vs. 0.35 U/mg) y que la actividad colagenasa (0.022 Hyp/mg/min vs. 0.0102 Hyp/mg/min). Se observaron grados de hidrólisis mayores sobre agua de cola de sardina crinuda (16.1 %), y no se registraron diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) en el agua de cola de sardina Monterey por el uso de las enzimas de vísceras de sardina Monterey y enzimas comercial. Se obtuvo mayor hidrólisis al aplicar la enzima de víscera de sardina Monterey sobre el agua de cola centrifugada (57.1 % vs. 17.4 %) sin importar la especie de sardina utilizada. La enzima comercial disminuyó la viscosidad sobre el agua de cola, mientras que la enzima de víscera de sardina Monterey lo hizo sobre el agua de cola centrifugada. La electroforesis mostró una disminución de la fracción  $PM > 220$  kDa en el agua de cola. Lo anterior, indicó que la enzima comercial tuvo una mayor actividad sobre agua de cola, mientras que la enzima de víscera de sardina Monterey lo tuvo en agua de cola centrifugada, sin importar el tipo de sardina utilizada para la elaboración del agua de cola.

**Palabras clave:** Viscosidad, Electroforesis, Actividad Enzimática, Grado de Hidrólisis, Colagenas

## ABSTRACT

We evaluated the effect of Monterey sardines viscera enzyme on stickwater treatment produced by crinuda and Monterey sardines and compared with commercial enzyme. In addition, we applied a complementary centrifugation to

add in test. Commercial enzyme has greater protease activity than Monterey sardines viscera (0.65 U/mg vs. 0.35 U/mg) and collagenase activity (0.022 Hyp/mg/min vs. 0.0102 Hyp/mg/min). Higher degree of hydrolysis on stickwater from crinuda sardine (16.1 %), and no significant differences ( $P \geq 0.05$ ) on stickwater from Monterey sardine between commercial enzyme and Monterey sardine viscera were observed. Degree of hydrolysis increased to application Monterey sardines viscera on centrifuged stickwater (57.1 % vs. 17.4 %) regardless of which sardine specie it came from. Commercial enzyme reduced viscosity on stickwater while Monterey sardines viscera did it on centrifuged stickwater. The electrophoresis showed reduction on  $MW > 220$  kDa fraction in stickwater. The above, showed that commercial enzyme have a better activity on stickwater while Monterey sardines viscera did it better on the centrifuged stickwater, regardless sardine specie which the stickwater came from.

**Keywords:** Viscosity, Electrophoresis, Enzymatic activity, Degree of Hydrolysis, Collagenase

## INTRODUCCIÓN

El establecimiento y procesamiento de plantas industriales como las productoras de harina de pescado traen como consecuencia la contaminación del mar por los desechos y las descargas de efluente como el agua de cola (Irlanda-Francis 2002; López-Ríos y Lechuga-Anaya 2001). El agua de cola (AC) es el subproducto del licor de prensa que se obtiene cuando la sardina entera se "reduce" para generar harina de pescado (Del Valle y Aguilera 1991) y representa el 60 % en peso del pescado utilizado. El AC es una emulsión (aceite / agua) con un pH cercano a 6.5, Esta emulsión es de color marrón y se comporta como un fluido no newtoniano (Goycoolea *et al.*, 1997). Asimismo, presenta alta turbidez,

fuerte olor y alta concentración de materia orgánica (Afonso y Borquez 2003; Afonso y Borquez 2002b), principalmente proteínas, las cuales son responsables de la viscosidad y del taponamiento de los sistemas de tratamiento referencia (Verbeek, *et al.*, 2012).

El AC sin tratar, es una fuente potencial de contaminación ambiental de costas y bahías, por lo tanto, dichos efluentes deben tratarse adecuadamente antes de ser vertidos al mar (García-Sifuentes, *et al.*, 2009). Además de reducir la contaminación, el tratamiento podría diseñarse para recuperar sólidos en suspensión y/o disueltos con valor económico y nutricional (Ahumada *et al.*, 2004).

Este efluente es reprocesado por la industria reductora de pescado para recuperar sólidos por medio de un evaporador de etapas múltiples (Kousoulaki, *et al.*, 2012), lo que mejora los rendimientos de la harina de pescado o se descarta en el mar. Este proceso no es eficiente debido al aumento de la viscosidad conforme aumenta el tiempo de evaporación causando problemas operacionales como obstrucción de tuberías e interrupción del paso del fluido (Jacobsen, 1985). Una forma de tratar este efluente es el uso de enzimas, donde se ha logrado reducir de 2 a 5 veces la viscosidad inicial, haciendo eficiente el proceso de evaporación y recuperación de sólidos y reduciendo el componente contaminante (Giorno y Drioli, 2000; Gildberg, 1993). Una variante en la opción anterior es mediante el uso de enzimas de las vísceras de especies marinas. Varios estudios han demostrado una alta actividad proteolítica a partir de las vísceras de sardinas con un amplio rango de estabilidad de pH (Castillo-Yáñez *et al.*, 2004; Castillo-Yáñez *et al.*, 2005; Castillo-Yáñez *et al.*, 2006; Gildberg, 1993; Gildberg y Almas, 1986; Krogdahl, 1985a; Krogdahl, 1985b), lo cual sugiere la posibilidad de producir concentrados a partir de estas vísceras y utilizarlas como una herramienta biotecnológica en niveles industriales. Actualmente, la industria de harina de pescado que la utiliza no ha generado suficiente información para proponer esquemas de ajuste y eficiencia del proceso.

El objetivo de este estudio fue el de comparar el efecto enzimático de un extracto comercial y otro extracto crudo obtenido de las vísceras de sardinas Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) con actividad colagenasa, así como una centrifugación complementaria en las características fisicoquímicas del agua de cola.

## MATERIALES Y METODOS

### Muestra

Las muestras de AC de sardina crinuda (*Ophystonema libertate* Günther, 1867) y sardina Monterey (*Sardinops sagax* Jenyns, 1842) fueron obtenidas de Propeguay S. A. de C. V. en Guaymas, Sonora México. Las muestras se colectaron en recipientes de plástico de un galón con tapón de rosca (DGN, 1980), y se enfriaron rápidamente en un baño de hielo y se trasladaron al Laboratorio de Productos Pesqueros del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD). Una vez en el laboratorio, una porción de AC se sometió a

una centrifugación complementaria (CC) en una centrífuga refrigerada Modelo Beckman J2-21 (Beckman Inc., Palo Alto, CA) a 17,648  $xg/25^{\circ}C/30$  min. El sobrenadante obtenido se denominó AC centrifugada (ACC), y ambas se utilizaron durante todas las pruebas llevadas a cabo antes y después de los tratamientos enzimáticos.

### Enzimas

El concentrado enzimático comercial (D) se obtuvo directamente del proveedor Dresen®, México, D.F. (Dresenzyme Proteasa®), mientras que el extracto crudo (V) se obtuvo en el laboratorio proveniente de las vísceras de sardina Monterey de promedios de peso y talla de 17.8 g y 45.7 cm respectivamente, siguiendo lo descrito por Martínez y Serra (1989). Se tomaron 100 g de vísceras y se mezclaron con 200 mL de agua fría, para posteriormente homogeneizarse durante 1 min. El homogeneizado se centrifugó a 26,000  $xg$   $4^{\circ}C/30$  min. La evaluación de la proteína D y V, se realizó usando albúmina suero bovino (1 mg/mL) como estándar de acuerdo a Bradford (1976).

### Actividad Proteolítica

La actividad proteolítica se evaluó siguiendo la metodología descrita por Castillo-Yáñez, *et al.*, (2004), usando caseína 1 % como sustrato. Se tomaron 20  $\mu$ L de D y V y se colocaron en microtubos de 1.5 mL para mezclarlos con 1 mL de solución de caseína a  $25^{\circ}C$ . Después de 20 min la reacción se detuvo con ácido tricloroacético (TCA) 20 % y llevados un baño de hielo por 10 min para posteriormente centrifugarlos a 6,500  $xg$  durante 5 min. El sobrenadante se separó y se midió la absorbancia a 280 nm. La actividad proteolítica se registró como cambio de absorbancia en 20 min de reacción. La actividad se expresó en unidades de actividad (UA).

### Actividad específica tipo tripsina y quimotripsina

Para estas determinaciones, se utilizó la técnica de microplacas de acuerdo con Oppert *et al.*, (1997). Se utilizaron sustratos específicos para tripsina y quimotripsina (p-N-Benzoyl-D-L-Arginine-p-Nitroanilide y N-Glutaryl-L-Phenylalanine-p-Nitroanilide, respectivamente) los cuales se obtuvieron de Sigma, ambos en concentraciones de 5 mg/mL y se mezclaron en 100 mL de buffer de trabajo (Tris-HCl 0.1 M pH 8.1;  $CaCl_2$  0.02 M) a  $25^{\circ}C$  durante 20 min para posteriormente colocarse en una microplaca de 96 pocillos en la fila superior (fila A). El resto de la microplaca (filas B-H) se le adicionaron 50  $\mu$ L de buffer de trabajo. Con la ayuda de una pipeta multicanal se realizaron diluciones en serie (1:1), desde el sustrato de la fila A hasta la fila G quedando la fila H sin sustrato (control negativo). Las enzimas se diluyeron en buffer de trabajo y se añadieron 50  $\mu$ L a cada pocillo con una pipeta multicanal. Las cantidades de enzimas añadidas a cada pocillo fueron de 10 mg y la actividad se midió en condiciones de agitación suave y constante. Durante la reacción, se midió la absorbancia cada 2 min a 410 nm. La actividad se registró como  $\mu$ g de p-nitroanilina/min/mg de proteína de

acuerdo con la ecuación  $AU = (A_{405nm}/\text{min}) (1000) (1/8800)$  (mg). (8800 = coeficiente de extinción molar de p- nitroanilina).

### Determinación de la actividad de colagenasa

La actividad colagenasa se determinó por medio de la metodología descrita por Erickson *et al.*, (1983). Los concentrados enzimáticos D y V se midieron usando colágeno extraído de las muestras. Se utilizaron 25 mg de colágeno como sustrato y se mezclaron con 1 mL de  $\text{CaCl}_2$  1.8 mM en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 4 mL del mismo buffer y 0.1 mL de concentrado enzimático (D: 0.016 mg de proteína y V: 0.452 mg de proteína). La mezcla se incubó a 40° C/3 h. Transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo aumentando la temperatura a 80° C por 10 min. La mezcla de reacción se filtró a través de papel Whatman No 1 para eliminar el colágeno residual. El contenido de hidroxiprolina (Hyp) se determinó en el filtrado según lo descrito por Vázquez-Ortiz *et al.* (2004).

### Tratamientos enzimáticos

Las condiciones de reacción fueron las mismas que las utilizadas en la industria durante el proceso del tratamiento del agua de cola (pH 6.5, 40° C, 40 min de reacción, excepto en el grado de análisis de hidrólisis, donde el pH utilizado fue de 8). La reacción se detuvo al aumentar la temperatura a 80° C (Jacobsen y Rasmussen, 1984) para medir viscosidad, grado de hidrólisis (GH) y patrones electroforéticos en las muestras antes y después de los tratamientos enzimáticos.

### Viscosidad

La viscosidad del AC, se determinó antes y después de los tratamientos enzimáticos. Se llevó a cabo en un reómetro Rheometrics Fluids Spectrometer RFS II provisto con RHI versión 4.2.X. Software (Rheometrics Inc., Piscataway, NJ), a una velocidad de cizalla de 50/s, deformación ( $\gamma$ ) 50 %, geometría de cono y plato. Se tomaron por separado 1.7 mL de las muestras y se mezclaron "in situ" con 0.016 UA de D y V (0.024 mg de D y 0.040 mg de V) y la viscosidad de la mezcla de reacción fue monitoreada a 40° C/40 min (Goycoolea, 1997).

### Grado de Hidrólisis (GH)

Para medir el grado de hidrólisis producido en las muestras, se utilizó la metodología descrita por Adler-Nissen (1986). Se usó un titulador automático Mettler Toledo DL21/25 (Mettler, Inc., Columbus, OH). Antes de comenzar la reacción, se ajustó el pH de las muestras a 8 con NaOH 1N. La cantidad de proteína en la mezcla de reacción (muestra + enzima) se llevó a 95 mg y la reacción se inició con 2.27 UA en ambas D y V (3.5 mg de D y 6.3 mg de V) a 40° C/40 min. Durante la reacción, se midió el consumo de NaOH 0.1 N. La reacción se detuvo aumentando la temperatura a 80° C, y GH se calculó usando la siguiente fórmula:  $GH = (B) (Nb) (1/\alpha) (1/MP) (1/h_{tot})$ , donde B: NaOH (mL) requerido para mantener el pH de la reacción en 8; Nb: normalidad de NaOH;  $1/\alpha$ , factor de disociación relacionado con la temperatura de reacción y pK de los grupos amino: MP proteína (g) en la mezcla de

reacción, y  $1/h_{tot}$  es el número de enlaces peptídicos total (meq/g) en la proteína.

### Análisis densitométrico de patrones electroforéticos

El perfil proteico de las muestras se determinó antes y después de los tratamientos enzimáticos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 10 %, de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (1970). Las muestras se mezclaron con 0.0624 UA de D y V (0.1 mg de D y 0.17 mg de V), y se detuvo la reacción con aumento de temperatura a 80° C. La electroforesis se llevó a cabo en Mini-PROTEAN® 3 Cell system (BioRad, Inc. Hercules, CA) a 25° C, pH 8.3 y 15 mA por gel. Se tomaron alícuotas de 37 µg de proteína de la mezcla de reacción, se añadieron al buffer muestra y se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 5 min y finalmente se cargaron en gel. Una vez terminada la corrida, el gel se tiñó con azul brillante Coomassie. Se usó un estándar de amplio rango (kDa) Bio-Rad como marcador de peso molecular: Miosina (200), β-galactosidasa (116.2), fosforilasa-B (97.4), albúmina de suero bovino (66.2), ovoalbúmina (45), anhidrasa carbónica (31), inhibidor de tripsina (21.5), lisozima (14.4) y aprotonina (6.5). Los patrones de proteínas en los geles se escanearon en BIO-RAD scanner model GS-700 (BioRad, Inc., Hércules, CA).

### Análisis estadístico

Los resultados generados mediante la aplicación del análisis estadístico se realizaron por triplicado y se analizaron en el software NCSS versión 5.1 (Kaysville, UT) mediante análisis de varianza y la comparación de medias por medio de la prueba de Duncan. El nivel de significancia establecida fue del 5 %

## RESULTADOS

### Caracterización de los extractos enzimáticos

El concentrado enzimático (extracto crudo de vísceras de sardina de Monterey "V") mostró una concentración de proteína mayor (6.8 veces), aunque menor actividad específica que el concentrado enzimático comercial (D). De la misma forma, D presentó mayor actividad colagenasa (0.022 µg Hyp/min/mg), 2.2 veces mayor que la detectada en V (0.0102 µg Hyp/min/mg) (tabla 1). La actividad específica de tripsina y quimotripsina fue mayor en V que en D (3.5 y 2.5, respectivamente) (figura 1). Estos resultados demuestran la alta actividad proteolítica de las vísceras de sardinas.

### Efecto de los tratamientos enzimáticos sobre la viscosidad

Al aplicar los tratamientos enzimáticos sobre las muestras de ambas especies, se observó una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) en viscosidad (figura. 2). Se observó cómo el efecto al agregar D en agua de cola (AC) de sardina Monterey (SM) redujo la viscosidad 22 %, mientras que V solo lo hizo 8 %. Cuando se utilizó agua de cola centrifugada (ACC) de MS como sustrato, se observó el efecto contrario, es decir, V favoreció la reducción de la viscosidad 31.8 %, mientras que

**Tabla 1.** Concentración de proteína, actividad específica y colagenasa de concentrado enzimático comercial y extracto crudo de vísceras de sardina de Monterey.

**Table 1.** Protein concentration, specific activity and collagenase from commercial enzyme concentrate and crude extract of Monterey sardine viscera.

	D	V
Concentración de proteína (mg/mL)	0.28 ± 0.01	1.9 ± 0.02
Actividad proteasa (UA/mg)	0.65 ± 0.03	0.36 ± 0.04
Actividad colagenasa (µg Hyp/g/min)	0.0220 ± 0.0070	0.0102 ± 0.0020

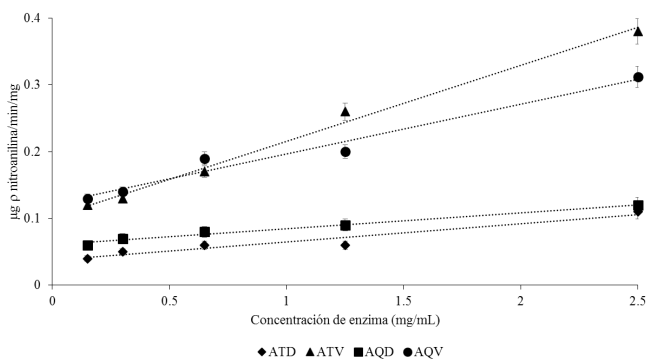
n=3

p<0.05

D = Concentrado enzimático comercial (Dresenzyme Proteasa®);

V = Concentrado enzimático (extracto crudo de víscera de sardina Monterey);

Hyp = Hidroxiprolina



**Figura 1.** Actividad específica de tripsina y quimotripsina de enzima comercial (Dresenzyme Proteasa®) (D) y extracto crudo de las vísceras de sardina (V).

**Figure 1.** Trypsin and chymotrypsin specific activity from commercial enzyme (Dresenzyme Protease®) (D) and crude extract from sardine viscera (V).

p<0.05

ATD = Actividad de tripsina de la Enzima comercial (Dresenzyme Proteasa®);

ATV = Actividad de tripsina del extracto crudo de víscera de sardina;

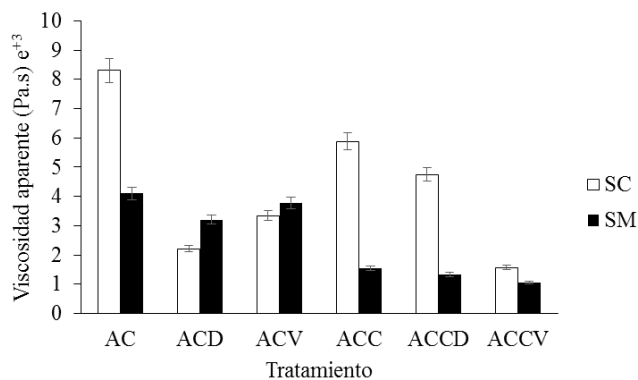
AQD = Actividad de quimiotripsina de la Enzima comercial (Dresenzyme Proteasa®);

AQV = Actividad de quimiotripsina del extracto crudo de víscera de sardina

D lo hizo en un 13.6 %. En el caso de AC de sardina crinuda (SC) ocurrió un efecto similar donde D produjo mayor disminución en la viscosidad (73.4 %) que el observado usando V (59.8%), mientras que en ACC de SC, V provocó una caída en viscosidad del 73.5% y D lo hizo en 19.4%. La viscosidad mostró una reducción significativa (p <0.05) en AC y ACC de ambas especies como resultado de la aplicación de tratamientos enzimáticos.

### Grado de hidrólisis

La figura 3 muestra, en AC de sardina crinuda, que la acción de D produjo mayor hidrólisis (16.1 %) que V; mientras que en ACC, V generó un mayor grado de hidrólisis (57.1 %). Por otro lado, en AC de SM no se observaron diferencias significativas (p <0.05) entre el uso de D y V; sin embargo, cuando los tratamientos enzimáticos se aplican en ACC, V



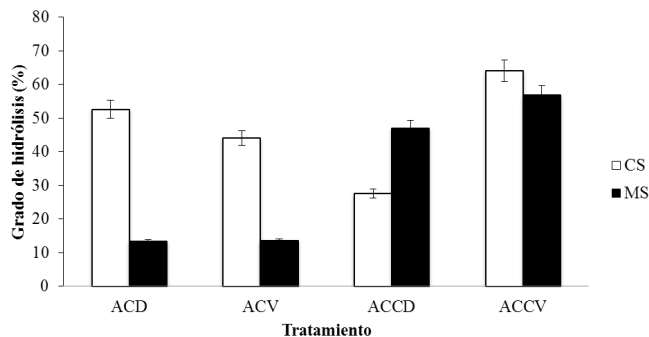
**Figura 2.** Efecto del tratamiento enzimático sobre la viscosidad aparente del agua de cola y el agua de cola centrifugada de sardina crinuda y sardina Monterey.

**Figure 2.** Effect of enzymatic treatment on the apparent viscosity of stick-water and centrifuged stickwater of crinude sardine and Monterey sardine.

n=3

p<0.05

SC = Sardina crinuda; SM = Sardina Monterey; AC = Agua de cola; ACD = Agua de cola + Enzima comercial (Dresenzyme Proteasa®); ACV = Agua de cola + extracto crudo de víscera de sardina; ACC = Agua de cola centrifugada; ACCD = Agua de cola centrifugada + Enzima comercial (Dresenzyme Proteasa®); ACCV = Agua de cola centrifugada + extracto crudo de víscera de sardina.



**Figura 3.** Monitoreo de la actividad hidrolítica del agua de cola y el agua de cola centrifugada de sardina crinuda y sardina Monterey.

**Figure 3.** Monitoring of hydrolytic activity of stickwater and the centrifuged stickwater from crinude sardine and Monterey sardine.

n=3

p<0.05

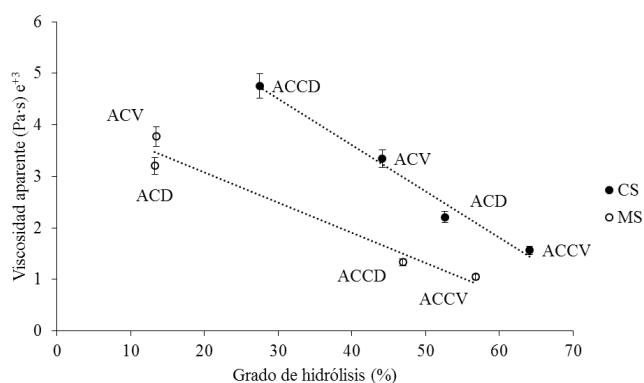
CS = Sardina crinuda; SM = Sardina Monterey; ACD = Agua de cola + Enzima comercial (Dresenzyme Proteasa®); ACV = Agua de cola + extracto crudo de víscera de sardina; ACCD = Agua de cola centrifugada + Enzima comercial (Dresenzyme Proteasa®); ACCV = Agua de cola centrifugada + extracto crudo de víscera de sardina.

genera mayor hidrólisis (17.4 %) que la observada con la implementación de D (p <0.05). La figura 4 describe esquemáticamente esta correlación, donde se muestra que la mayoría de la actividad hidrolítica se obtuvo en ACC, lo que sugiere que la centrifugación complementaria propuesta en este estudio afectó positivamente la acción de los tratamientos enzimáticos.

### Análisis densitométrico de patrones electroforéticos

En las figuras 5 y 6 se presentan los patrones electroforéticos de AC y ACC tanto de sardina crinuda y sardina





**Figura 4.** Correlación del grado de hidrólisis con viscosidades del agua de cola y agua de cola centrifugada antes y después del tratamiento enzimático.

**Figure 4.** Correlation of hydrolysis degree and viscosities from stickwater and centrifuged stickwater before and after enzymatic treatments. SC = *Sardina crinuda*; SM = *Sardina Monterey*; ACD = Agua de cola + Enzima comercial (Dresenzyme Proteasa®); ACV = Agua de cola + extracto crudo de víscera de sardina; ACCD = Agua de cola centrifugada + Enzima comercial (Dresenzyme Proteasa®); ACCV = Agua de cola centrifugada + extracto crudo de víscera de sardina.

Monterey realizado en el presente estudio. En ellas se puede observar el efecto de la centrifugación complementaria en el perfil de proteína al reducir significativamente la fracción de alto peso molecular (220 a >116 kDa). Los hallazgos sugieren que los residuos de PM > 220 kDa son agregados covalentes, que se mantienen en suspensión / solución y no son sedimentables por la fuerza centrífuga de la centrifugación complementaria.

## DISCUSIÓN

En las condiciones de trabajo, el manejo y procesamiento enzimático de los subproductos en la industria reductora Propeguay, la enzima comercial "D" obtuvo más eficiencia que la enzima de vísceras de sardina (V), al reducir la viscosidad del AC producida por ambas especies de sardina (crinuda y Monterey), aunque con una mayor eficiencia en el AC de sardina crinuda. Sin embargo, cuando se incluyó la centrifugación complementaria como una operación unitaria adicional, su combinación con la adición de V generó los mejores resultados, con una reducción del 81.2 % de ACC de sardina crinuda y del 74.6 % para el ACC de sardina de Monterey, comparada contra su correspondiente AC.

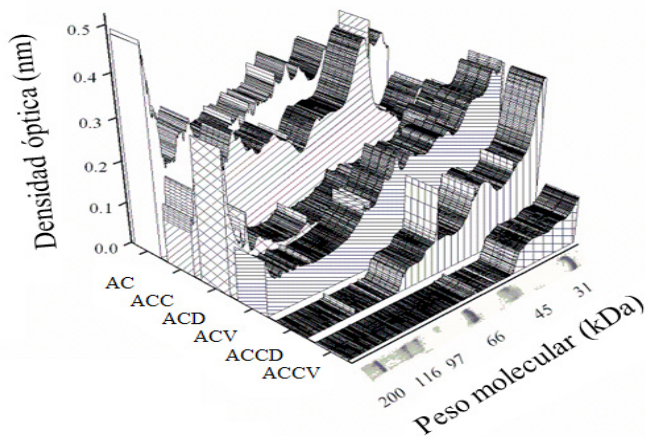
La alta actividad enzimática presente en las vísceras de peces ya ha sido reportada por Castillo-Yañez *et al.*, (2006); quienes las consideran como una fuente viable de proteasas para los procesos biotecnológicos. Jacobsen (1985), utilizó concentrados enzimáticos comerciales (neutralasa y alcalasa Novozymes™ (Bagsvaerd, DK)) en el tratamiento de AC en diferentes especies, obteniendo una reducción significativa de la viscosidad (20-50 %), presentándolos como una herramienta biotecnológica, también reportó que un tratamiento enzimático promueve la capacidad de concentrar el AC en los evaporadores. La actividad tipo tripsina encontrada en este estudio sugiere la existencia de péptidos o proteínas ricas en

lisina y arginina, encontrándose además una mayor actividad tipo quimotripsina, que asume una alta concentración del aminoácido fenilalanina, tirosina, triptófano y leucina en solución. Estos resultados concuerdan con los reportados por Castillo-Yañez *et al.*, (2005) y Castillo-Yañez *et al.*, (2006) que caracterizaron las actividades tipo tripsina y quimotripsina de las vísceras de sardinas Monterey (*Sardinops sagax caerulea*), en donde encontraron más actividad de quimotripsina esterasa (BTEE, 1680 U/mg) que amidasa (SAAPNA, 52 U/mg), mientras que la actividad tripsina esterasa fue ligeramente mayor (TAME, 29 U/mg) que la actividad de amidasa (BAPNA, 6.5 U/mg).

Los resultados indican que la reducción de la viscosidad está directamente relacionada con el grado de hidrólisis, lo que demuestra que D favorece la hidrólisis en AC, mientras que V hidroliza el ACC en mayor grado, independientemente de la especie que la genera. Es importante señalar que un mayor grado de hidrólisis no se refleja necesariamente en una menor viscosidad, ya que eso dependerá de las actividades "endo" o "exo" de las enzimas implicadas.

Los hallazgos en esta investigación sugieren que esta actividad es similar en D y V, independientemente que la actividad colagenasa sea mayor en D cuando se utilizó. Esta diferencia en la concentración, probablemente debido a la concentración de soluto totales disueltos no proteicos pero si sedimentables, refleja claramente el efecto de centrifugación complementaria y se hace aún más evidente al observar la figura 3 donde se muestra la tendencia del contenido de colágeno en AC y ACC para ambas especies vs. la viscosidad. La figura 2 muestra diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) sobre la viscosidad inicial entre AC de SC (0.0083 Pa.s) y AC de SM (0.0041 Pa.s). Esta diferencia se debe a un mayor contenido de sólidos totales en la primera (11.2 % vs. 9.0 %), pero principalmente a un mayor contenido de colágeno (11.7 vs. 3 mg/g). El efecto de la centrifugación complementaria fue significativo ( $p < 0.05$ ) en ambos casos pero de mayor magnitud en AC de SM cuando se redujo de 0.00410 Pa.s a 0.00154 Pa.s (62.4%); mientras que la reducción en AC de SC fue de 0.0083 Pa.s a 0.0059 Pa.s (28.9%). A pesar de lo anterior, la viscosidad del agua de cola centrifugada de SC (0.0059 Pa.s) fue mayor ( $p < 0.05$ ) que el agua de cola centrifugada de SM (0.00154 Pa.s). Esta diferencia se explica en términos de residuos de colágeno en ACC de sardina crinuda (3.30 vs. 0.87 mg/g) y ya no al contenido de sólidos totales. Estos resultados corroboran la importancia del contenido de colágeno en la viscosidad del AC al establecer una tendencia entre ambas variables. La información previa confirma por qué la viscosidad del AC de sardina crinuda es mayor que el AC de sardina Monterey.

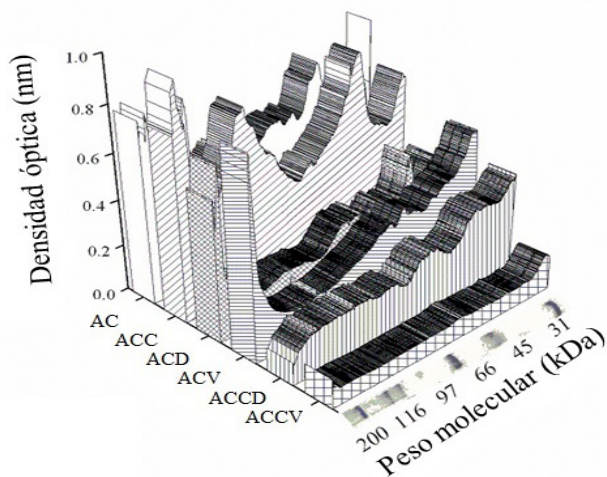
El análisis de los densitogramas indica que los tratamientos enzimáticos actuaron preferentemente sobre proteínas con mayor peso molecular y de forma más eficiente en ACC. Los resultados confirman que V produjo mayor hidrólisis en ACC, mientras que D lo hizo mejor en AC, independientemente de la especie que los genera, lo que se explica en términos de mayor actividad de colagenasa en el último. Nuestro resultado muestra que la mayoría de las proteínas o



**Figura 5.** Efecto de los tratamientos enzimáticos en el perfil de proteína en agua de cola (AC) y agua de cola centrifugada (ACC) de sardina crinuda durante 40 minutos de reacción.

**Figure 5.** Effect on protein profile by enzymatic treatments in stickwater (S) and centrifuged stickwater (CS) on crinude sardine in 40 minutes.

AC = Agua de cola; ACC = Agua de cola centrifugada; ACD = Agua de cola + Enzima comercial (Dresenzyme Proteasa®); ACV = Agua de cola + extracto crudo de víscera de sardina; ACCD = Agua de cola centrifugada + Enzima comercial (Dresenzyme Proteasa®); ACCV = Agua de cola centrifugada + extracto crudo de víscera de sardina.



**Figura 6.** Efecto de los tratamientos enzimáticos en el perfil de proteína en agua de cola (AC) y agua de cola centrifugada (ACC) de sardina Monterey durante 40 minutos de reacción.

**Figure 6.** Effect on protein profile by enzymatic treatments in stickwater (S) and centrifuged stickwater (CS) on Monterey sardine in 40 minutes.

AC = Agua de cola; ACC = Agua de cola centrifugada; ACD = Agua de cola + Enzima comercial (Dresenzyme Proteasa®); ACV = Agua de cola + extracto crudo de víscera de sardina; ACCD = Agua de cola centrifugada + Enzima comercial (Dresenzyme Proteasa®); ACCV = Agua de cola centrifugada + extracto crudo de víscera de sardina.

péptidos encontrados en AC y ACC están entre los 116 a 45 kDa, datos comparables con los de Bechtel, P.J. (2005), que observaron la presencia de una gran cantidad de proteínas y/o polipéptidos en la fracción de 189-39 kDa en *Theragra chalcogramma*, *Mycteroperca interstitialis* y *Oncorhynchus nerea*.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, se propone utilizar las vísceras de sardina generadas en el proceso de enlatado, como un subproducto viable para generar a su vez un concentrado enzimático que podría usarse en el tratamiento del AC. Además, se encontró que los mejores tratamientos de AC, independientemente de la especie generada, fueron la sinergia entre la centrifugación suplementaria y el uso de enzimas de víscera de sardina Monterey, por lo que se recomienda introducir al tratamiento del AC actual una centrifugación complementaria adicional con el objetivo de eliminar la materia orgánica. Para finalizar, nuestros resultados sugieren la posibilidad de derivar este proyecto a un desarrollo tecnológico, sin embargo debe complementarse con estudios para confirmar su viabilidad tecnológica total y la viabilidad financiera correspondiente.

## REFERENCIAS

- Adler-Nissen J. 1986. Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers. New York. USA. Edición. Pp. 427
- Afonso, M.D. y Borquez, R. 2003. Nanofiltration of wastewaters from the fish meal industry. *Desalination*. 151: 131-138.
- Afonso, M.D. y Borquez, R. 2002b. Review of the treatment of seafood processing wastewaters and recovery of proteins therein by membrane separation processes prospects of the ultrafiltration of wastewaters from the fish meal industry. *Desalination*. 142: 29-45.
- Ahumada, R., Rudolph, A. y Contreras, S. 2004. Evaluation of coastal waters receiving fish processing waste: Lota Bay as a case study. *Environ Monit Assess*. 90: 89-99.
- Bechtel, P.J. 2005. Properties of Stickwater from fish processing byproduct. *J Aquat Food Prod Technol*. 14: 25-38
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-54
- Castillo-Yáñez, F.J., Pacheco-Aguilar, R., García-Carreño, F.L. y Navarrete-Del Toro, M. A. 2004. Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chem*. 85: 343-50
- Castillo-Yáñez, F.J., Pacheco-Aguilar, R., García-Carreño, F.L. y Navarrete-Del Toro, M. A. 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *Comp Biochem Physiol B*. 140: 91-98
- Castillo-Yáñez, F.J., Pacheco-Aguilar, R., García-Carreño, F.L., Navarrete-Del Toro, M. A. y Félix-López, M. 2006 Purification and biochemical characterization of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caeruleus*). *Food Chem*. 99: 252-9
- Del Valle J. y Aguilera, J. 1991. Physicochemical characterization of raw fish and stickwater from fish meal production. *J Sci Food Agric*. 54: 429-41

- DGN. 1980. Aguas Residuales. Muestreo. In *NMX-AA-003-1980*. México, DF. Pag 2-4
- Erickson, M.C., Gordon, D.T. y Anglemeier, A.F. 1983. Proteolytic activity in the sarcoplasmic fluids of parasitized Pacific whiting (*Merluccius productus*) and unparasitized true cod (*Gadus macrocephalus*). *J Food Sci.* 48: 1315-1319.
- García-Sifuentes, C. O., Pacheco-Aguilar, R., Valdez-Hurtado, S., Márquez-Ríos, E., Lugo-Sánchez, M. E., y Ezquerro-Brauer, J. M. (2009). Impact of stickwater produced by the fishery industry: treatment and uses. *CyTA—Journal of Food.* 7(1): 67-77.
- Gildberg, A. 1993. Enzymatic Processing of Marine Raw Materials. *Process Biochem.* 28: 1-15.
- Gildberg, A. y Almas, K.A. 1986. Utilization of fish viscera. In: M. Maguer and P. Jelen (eds) *Food Engineering and Process Applications*, London, UK: Elsevier Science Publications. Pp. 388-393.
- Giorno, L. y Drioli, E. 2000. Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. *Trends in Biotech.* 18: 339-349
- Goycoolea, F., Nieblas, J., Noriega, L. y Higuera-Ciapara, I. 1997. Temperature and concentration effects on the flow behaviour of stickwater. *Bioresour Technol.* 59: 217-225
- Irlanda-Francis, G.G. 2002. Contaminación de la Bahía de Guaymas, Dirección General de Medio informativo. Universidad de Sonora, Hermosillo, México.
- Jacobsen, F. 1985. Effect of enzymatic treatment of stickwater on evaporator capacity and fouling. *Process Biochem.* 20: 103-108
- Jacobsen, F. y Rasmussen, O. 1984. Energy savings through enzymatic treatment of stickwater in the fishmeal industry. *Process Biochem.* 18: 165-169
- Kousoulaki, K., Olsen, H. J., Albrektsen, S., Langmyhr, E., Mjøs, S. A., Campbell, P., y Aksnes, A. (2012). High growth rates in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed 7.5% fish meal in the diet. Micro-, ultra- and nano-filtration of stickwater and effects of different fractions and compounds on pellet quality and fish performance. *Aquaculture.* 338: 134-146
- Krogdahl, A. 1985a. Fish viscera silage as a protein source for poultry. I. Experiments with layer-type chicks and hens. *Acta Agr Scand.* 35: 3-23
- Krogdahl, A. 1985b. Fish viscera silage as a protein source for poultry. II. Experiments with meat-type chickens and ducks. *Acta Agr Scand.* 35: 24-32
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685
- López-Ríos, O. y Lechuga-Anaya, M. 2001. Contaminantes en los Cuerpos de Agua del Sur de Sonora. *Salud Pública México.* 43: 289-305
- Martinez, A., Serra, J.L. 1989. Proteolytic activities in the digestive tract of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Comp Biochem Physiol B.* 93: 61-6
- Oppert, B., Kramer, K.J. y McGaughey, W.H. 1997. Rapid microplate assay for substrates and inhibitors of proteinase mixtures. *BioTechniques.* 23: 70-72
- Vázquez, O.F.A., Morón, F.O.E. y González, M.N.F. 2004. Hydroxyproline measurement by HPLC: Improved method of total collagen determination in meat samples. *J Liq. Chromatogr. RT.* 27(17): 2771-2780.
- Verbeek, C. J. R., Lay, M. C., y Higham, C. 2012. Protein intercalated bentonite recovered using adsorption from stickwater. *Waste and Biomass Valorization*, 3(1): 109-115.