

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS BIOLÓGICOS COMO MEDIO PARA
APROVECHAR Y MEJORAR LA DISPOSICIÓN FINAL DE LOS RESIDUOS DE
PIEL DE TIBURÓN AZUL (*Prionace glauca*)**

por

Leila Rocío MOLINA MASTANDREA

TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias
Veterinarias.

Orientación: Higiene, Inspección-
Control y Tecnología de los Alimentos
de Origen Animal.

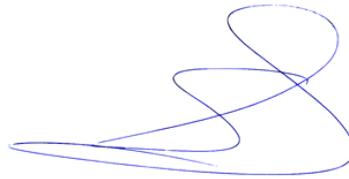
MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2021**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Dr. Santiago Díaz

Segundo miembro (Tutor):



Dra. Cristina Friss de Kereki

Tercer miembro:



Dr. Ariel Aldrovandi

Cuarto miembro (Co-tutor):

Dra. Carina Galli

Fecha:

3 de agosto de 2021

Autor:

Br. Leila Rocío Molina Mastandrea

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que formaron parte de este trabajo, en particular a las Dras. Cristina Friss de Kereki y Carina Galli, por la paciencia, dedicación y apoyo que me brindaron durante este tiempo. Al Br. Gonzalo Chalela, un pilar fundamental de este trabajo, quien me abrió las puertas del laboratorio y con gran compromiso y dedicación me guió en cada etapa del proyecto. Al Dr. Gonzalo Crosi por brindar información estadística actualizada y por sus apreciaciones sobre la redacción; por estar siempre atento a las necesidades que surgieron durante el proyecto. Al Dr. Santiago Díaz por facilitar la materia prima siempre que fue necesario y por evacuar las dudas que fueron surgiendo. A todo el equipo del IIP por hacerme sentir una más, y muy especialmente al Sr. Heber Da Costa, por recibirme siempre con calidez y alegría. A los veterinarios de las plantas procesadoras por su amable colaboración en las encuestas y al Dr. Alejandro Uval por su asesoramiento respecto al uso de la enzima comercial. A mi hermana la Lic. Nazarena Molina y a mi amiga la Dra. Florencia Ruppel, por dedicar su tiempo a leer y aportar sus apreciaciones sobre la redacción de este trabajo.

A mis padres y hermanas por su apoyo incondicional, por la fuerza para seguir adelante y por su gran contribución a la persona que soy hoy. A mis amigos, los de la vida, los de la carrera y los del trabajo, por entender cuando tenía que estudiar, por animarme en mis fracasos y compartir mis alegrías en los aciertos.

Por último, y no menos importante, a los animales, por despertar en mí la pasión que me forjó a trazar mi camino hasta donde me encuentro hoy.

A todos, de corazón, ¡Gracias!

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	6
1. RESUMEN.....	7
2. SUMMARY	9
3. INTRODUCCIÓN	10
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
4.1. Tiburón azul (<i>Prionace glauca</i>).....	11
4.1.1. Introducción	11
4.1.2. Biología	12
4.1.3. Distribución mundial	13
4.1.4. Importancia comercial	16
4.1.5. Situación nacional	17
4.1.6. Piel de tiburón azul	18
4.2. Hidrolizados de pescado	19
4.2.1. Hidrolizados químicos.....	20
4.2.2 Hidrolizados biológicos	21
4.2.2.1. Agentes microbianos	21
4.2.2.2. Enzimas	23
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVOS	25
6.1. Objetivo general	25
6.2. Objetivos particulares	25
7. MATERIALES Y MÉTODOS	26
7.1 Reconstitución de cepas liofilizadas de <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC® 8014™* y cultivo starter	26
7.2. Ensayo con <i>Lactobacillus plantarum</i>	27
7.3. Ensayo con enzima comercial FPH Novozymes	27
7.4. Recolección de datos	28
7.5. Análisis estadístico	29
8. RESULTADOS	30
8.1. pH.....	30

8.2. Inspección de las muestras	31
8.2.1 Ensayos con <i>Lactobacillus plantarum</i>	31
8.2.2 Ensayos con enzima comercial	35
8.3. Hidrolizados	36
8.4. Composición química proximal	36
8.5. Encuesta	36
9. DISCUSIÓN	38
10. CONCLUSIONES	41
11. BIBLIOGRAFÍA	42
12. ANEXOS	46

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

	Página
Tabla 1 Taxonomía del tiburón azul (<i>Prionace glauca</i>)	11
Tabla 2 Producción de captura global de tiburón azul (<i>Prionace glauca</i>) 2012-2016	17
Tabla 3 Exportación de tiburón azul (<i>Prionace glauca</i>) en los últimos 5 años	17
Tabla 4 Producción nacional de tiburón azul (<i>Prionace glauca</i>)	18
Tabla 5 Comparación de la composición química de piel de tiburón azul	19
Tabla 6 Evolución diaria del olor en muestras inoculadas con <i>Lactobacillus plantarum</i> y control	31
Tabla 7 Comparación de la degradación lograda cada día en los hidrolizados de piel de tiburón azul con diferentes dosis de inóculo (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	32
Tabla 8 Estudio de la evolución diaria (siete días) de la degradación lograda en los hidrolizados de piel de tiburón azul con diferentes dosis de inóculo (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	33
Tabla 9 Medición del índice de refracción en las diferentes muestras	35
Tabla 10 Composición química proximal de los diferentes ensayos	36

FIGURAS

Figura 1 Tiburón azul (<i>Prionace glauca</i>)	12
Figura 2 Mapa de distribución mundial	13
Figura 3 Mapa de migraciones de hembras de tiburón azul en el Pacífico norte	14
Figura 4 Mapa de migraciones de machos de tiburón azul en el Pacífico norte	14
Figura 5 Mapa de migraciones de tiburón azul en el Atlántico norte durante otoño-invierno	15
Figura 6 Mapa de migraciones de tiburón azul en el Atlántico norte durante primavera-verano	16
Figura 7 Cambios de pH en ensayos con <i>Lactobacillus plantarum</i> y enzima comercial	30
Figura 8 Evolución del sobrenadante en las diferentes muestras	33
Figura 9 Evolución del sedimento en las diferentes muestras	34
Figura 10 Evolución del grado de degradación en las diferentes muestras.....	34

1. RESUMEN

Los residuos de piel de tiburón azul (*Prionace glauca*) son un problema para la industria pesquera nacional, ya que, debido a la naturaleza de sus escamas y al mecanismo de acción de los equipos industriales, no puede ser procesada en forma de harina, por lo que debe ser desechada y enterrada tal cual fue extraída.

El presente estudio buscó desarrollar hidrolizados a partir de dichos residuos, empleando y comparando dos formas de degradación biológica: *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™* con una concentración de $1,5 \times 10^8$ células/ml y enzima comercial FPH Novozymes adicionada al 0,33% y 0,5%.

En primer lugar, se realizó un análisis de la composición química proximal de la materia prima, para su posterior comparación con los hidrolizados resultantes. La misma fue obtenida de dos plantas procesadoras de pescado, ubicadas en los Departamentos de Montevideo y Lavalleja, Uruguay. Se midieron diariamente valores de pH y °Brix, sumado a una minuciosa inspección de los hidrolizados. Del análisis de los resultados se desprende que la enzima comercial actuó en menor tiempo (24 horas), en comparación con *Lactobacillus plantarum*, el cual requirió de un período de 7 días para la hidrólisis completa.

Las muestras inoculadas con *Lactobacillus plantarum* fueron afectadas por el grupo con inóculo 5%, ya que presentaron una diferencia significativa de $p=0,013$ en comparación con el inóculo 10% y de $p=0,027$ en comparación con las muestras tratadas con el inóculo 15%. Por otro lado, no hubo diferencia significativa entre las muestras tratadas con inóculo 10% y 15% ($p=0,83$). Por su parte, las muestras inoculadas con enzima comercial respetaron un valor constante de pH 6.

A su vez, de las muestras tratadas con *Lactobacillus plantarum*, la que presentó menor variación de valores de pH es la que trabajó con un inóculo de 10%, obtuvo un promedio de $4,22 \pm 0,12$, y un valor mínimo de 4,09 y un máximo de 4,40.

Respecto a las muestras tratadas con un 15% de inóculo, obtuvieron un valor mínimo de 4,03 y un máximo de 4,75, con un promedio de $4,24 \pm 0,24$. Por último, las muestras tratadas con inóculo 5% presentaron un promedio de $4,68 \pm 0,61$, un valor máximo de 6,05 y un mínimo de 4,33.

En cuanto a las características físicas, el hidrolizado logrado con la enzima comercial fue un producto líquido, color ámbar claro y con olor amoniacal suave; en cambio el hidrolizado obtenido por *Lactobacillus plantarum* fue una mezcla pastosa, de color marrón oscuro y con olor a fermento. En la composición química proximal del hidrolizado obtenido con *Lactobacillus plantarum* se obtuvieron los siguientes resultados: humedad $69,5 \pm 2,6\%$, proteínas $19,5 \pm 2,9\%$, cenizas $10,5 \pm 0,1\%$ y grasas $0,10\%$. Mientras que el obtenido por enzima comercial presentó humedad $90,44 \pm 0,6\%$, proteínas $10,5 \pm 0,6\%$ y cenizas $0,64 \pm 0,01\%$.

Tras la realización de entrevistas a veterinarios de plantas procesadoras de pescado, se evaluó la posible aplicación de los métodos planteados en esta tesis a nivel de la industria pesquera en Uruguay, llegándose a concluir que el método elegido por la mayoría de ellos es el enzimático, y, aunque la mayor parte de los encuestados no cuenta con los equipos necesarios para su implementación, están dispuestos a adquirirlos si el costo de producción es menor al actual método de disposición de residuos. En ese sentido, tras un análisis económico de los métodos, se logró determinar que el costo de producción de hidrolizados es sustancialmente mayor que el de disposición de residuos para compostaje.

Finalmente, los resultados del presente estudio confirmaron la posibilidad de obtener hidrolizados de piel de tiburón azul por acción de inóculos de *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™* así como por el uso de enzima comercial FPH (Novozymes).

2. SUMMARY

Blue shark (*Prionace glauca*) skin wastes are a problem for the national fishing industry, since, due to the nature of its scales and the mechanism of action of industrial equipment, it cannot be processed in the form of flour, for what must be discarded and buried as it was extracted.

The present study sought to develop hydrolysates from said residues, using and comparing two forms of biological degradation: *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™ * with a concentration of $1,5 \times 10^8$ cells/ml and commercial enzyme FPH Novozymes added at 0,33% and 0,5%.

In the first place, an analysis of the proximal chemical composition of the raw material was carried out, for its subsequent comparison with the resulting hydrolysates. It was obtained from two fish processing plants, located in the Departments of Montevideo and Lavalleja, Uruguay. PH and ° Brix values were measured daily, in addition to a thorough inspection of the hydrolysates. From the analysis of the results, the commercial enzyme acted in a shorter time (24 hours), compared to *Lactobacillus plantarum*, which required a period of 7 days for complete hydrolysis.

The samples inoculated with *Lactobacillus plantarum* were affected by the group with inoculum 5%, since they presented a significant difference of $p = 0,013$ compared to the inoculum 10% and $p = 0,027$ compared to the samples treated with the inoculum 15%. On the other hand, there was no significant difference between the samples treated with 10% and 15% inoculum ($p = 0,83$). For their part, the samples inoculated with commercial enzyme respected a constant value of pH 6.

In turn, of the samples treated with *Lactobacillus plantarum*, the one that presented the least variation in pH values is the one that worked with an inoculum of 10%, obtained an average of $4,22 \pm 0,12$, and a minimum value of 4,09 and a maximum of 4,40.

Regarding the samples treated with 15% inoculum, they obtained a minimum value of 4,03 and a maximum of 4,75; with an average of $4,24 \pm 0,24$. Finally, the samples treated with inoculum 5% presented an average of $4,68 \pm 0,61$, a maximum value of 6,05 and a minimum of 4,33.

Regarding the physical characteristics, the hydrolyzate obtained with the commercial enzyme was a liquid product, light amber color and with a mild ammonia odor; On the other hand, the hydrolyzate obtained by *Lactobacillus plantarum* was a pasty mixture, dark brown in color and with an odor of ferment. The following results were obtained in the proximal chemical composition of the hydrolyzate obtained with *Lactobacillus plantarum*: humidity $69,5 \pm 2,6\%$, proteins $19,5 \pm 2,9\%$, ashes $10,5 \pm 0,1\%$ and fats 0,10%. While that obtained by commercial enzyme presented humidity $90,44 \pm 0,6\%$, proteins $10,5 \pm 0,6\%$ and ash $0,64 \pm 0,01\%$.

After conducting interviews with veterinarians of fish processing plants, the possible application of the methods proposed in this thesis at the level of the fishing industry in Uruguay was evaluated, reaching the conclusion that the method chosen by most of them is enzymatic, and, although most of those surveyed do not have the necessary equipment for its implementation, they are willing to purchase it if the production cost is lower than the current waste disposal method. In this sense, after an economic analysis of the methods, it was determined that the cost of producing hydrolysates is substantially higher than that of disposing of waste for composting.

Finally, the results of the present study confirmed the possibility of obtaining hydrolysates from blue shark skin by the action of inoculum of *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™ * as well as using commercial enzyme FPH (Novozymes).

3. INTRODUCCIÓN

La industria de procesamiento de pescado genera una gran cantidad de residuos cuando se tratan como desechos y no como subproductos recuperables. Estos representan una importante fuente de contaminación ambiental y costos asociados al llenado de tierras o descomposición con escaso beneficio generado, lo que hace necesario su aprovechamiento con el fin de minimizar los impactos económicos y ambientales (Shan, Franco y Zhang, 2013; Kuley et al., 2019).

En Uruguay, una de las principales especies exportadas dentro de los productos pesqueros, es el tiburón azul (*Prionace glauca*). En los últimos años, esta especie ocupa el cuarto lugar en términos de toneladas siendo Brasil el principal país destino adquiriéndolo en presentación de producto congelado (DINARA, 2016; DINARA, 2017; DINARA, 2018; DINARA, 2019).

Desde el año 2002, el tiburón azul es ingresado al país en régimen de admisión temporaria para su reprocesamiento, procediendo de diferentes zonas de captura. (Benítez, Dragonetti, Friss de Kereki, Ayçaguer y Varela, 2009).

A nivel mundial los tiburones son explotados para consumo de su carne fresca, congelada, seca, salada o ahumada; de sus aletas para producir sopa; de aceite de hígado utilizado en la industria cosmética y farmacéutica, por ser rico en vitamina A, vitamina D y escualeno; de sus dientes y vértebras para la producción de joyería y artesanías; y de su piel con la que se realizan bolsos, carteras y zapatos; y como dato anecdótico, un procesador de pequeña escala en Java occidental ha llegado a producir galletas de piel de tiburón (Domingo, Forselledo, Miller y Passadore, 2008; Kim, 2014).

A nivel nacional, las plantas que reprocesan tiburón azul realizan la extracción de la piel del mismo (desollado o cuereado), lo cortan en trozos o rodajas y lo congelan *IQF* (Individual Quick Freezing) (Benítez et al., 2009).

En cuanto a los residuos de piel de tiburón azul, debido a la naturaleza de sus escamas y al mecanismo de acción de los equipos industriales, no puede ser procesada en forma de harina, por lo que debe ser desechada y enterrada tal cual fue extraída, proceso llevado a cabo por empresas habilitadas para tal fin (Bioterra es un ejemplo).

Actualmente, debido al exceso de los residuos antes mencionados, surge la necesidad de utilizar nuevas tecnologías limpias, simples y que tiendan a disminuir el impacto ambiental. Una alternativa a ello es producir un hidrolizado biológico a partir de un agente fermentativo, *Lactobacillus plantarum*, el cual resulta de una sencilla manipulación y requiere de sustratos fácilmente obtenibles, como azúcares y melazas (Wiki, Panné Huidobro y Manca, 2006). Además, es posible utilizar enzimas para la hidrólisis de proteínas de la piel de tiburón, las cuales son obtenidas a partir de microorganismos del género *Bacillus* y *Aspergillus*. Las mismas son utilizadas en diversos procesos industriales de la elaboración de alimentos, ya sea como ingredientes alimentarios con propiedades funcionales específicas o por razones fisiológicas o médicas; mejoran el valor nutricional, el costo, el sabor, la solubilidad y la funcionalidad de los alimentos (De Man, Finley, Hurst y Lee, 2018).

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. Tiburón azul (*Prionace glauca*)

4.1.1. Introducción

El tiburón azul (*Prionace glauca*, Linnaeus 1758) es una especie perteneciente a la familia Carcharhinidae ubicada dentro de la clase Chondrichthyes (Tabla 1), es decir, que poseen mandíbula y esqueleto cartilaginoso (Pough, Heiser y Janis, 1996). A su vez, al pertenecer a la subclase Elasmobranchii, se caracterizan por su método de osmorregulación, el mismo depende de mantener altos niveles tisulares de urea, lo que constituye importantes consecuencias en el procesamiento de la carne (Durga, Poojaben, Raj y Yagnesh, 2020).

Los condriictios son los vertebrados más antiguos, de hecho, habitan la Tierra desde hace 400 millones de años, según Grogan y Lund (2004), peces morfológicamente similares a los tiburones de hoy en día coexistían con los dinosaurios.

Los peces cartilagosos varían desde planctívoros hasta depredadores de la cúspide de la cadena trófica, como son los tiburones; y a su vez, presentan todas las formas reproductivas existentes, desde ovíparos hasta vivíparos placentarios (Snelson, Roman y Burgess, 2008).

Según FAO (1994) y Compagno (2008), existen cerca de 1.160 especies de condriictios (aproximadamente 350 de ellas son tiburones), de las cuales cerca de un 2.5% habitan aguas oceánicas mar adentro, lejos de las plataformas continentales. A pesar de que las aguas oceánicas son menos productivas y presentan menor diversidad y disponibilidad de alimentos en comparación con aguas costeras, existen zonas calientes con alta productividad y mejores índices de biomasa y diversidad; las mismas se asocian a remolinos y montes submarinos (Worm, Lotze y Myers, 2003). En ese sentido, la capacidad de migrar largas distancias para adaptarse a las condiciones supone una característica fundamental para la supervivencia de las especies, por ejemplo, el recurso en estudio (*Prionace glauca*), es capaz de realizar grandes migraciones transoceánicas (Kohler y Turner, 2008).

Tabla 1: Taxonomía del tiburón azul (*Prionace glauca*)

Taxonomía

Reino	Animal
Phylum	Chordata
Clase	Chondrichthyes
Sub clase	Elasmobranchii
Super orden	Euselachii
Orden	Carcharhiniformes
Familia	Carcharhinidae
Género	Prionace
Especie	Prionace glauca (Linnaeus, 1758)

Fuente: Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS).

4.1.2. Biología

El tiburón azul posee un cuerpo delgado con aletas pectorales largas, su color es azul índigo en el dorso, azul metálico en los flancos y blanco en su zona ventral; su tamaño es relativamente grande, llegando algunos ejemplares a alcanzar los 380 cm de longitud, con aparente similitud entre hembras y machos (Fig. 1) (Nakano y Stevens, 2008).

Su alimentación consiste en pequeños peces pelágicos y cefalópodos, en especial calamares; aunque eventualmente se han hallado en su estómago crustáceos pelágicos, pequeños tiburones e incluso aves marinas. Si bien pueden alimentarse durante todo el día, son especialmente activos durante la noche, con un pico de actividad al atardecer a través de movimientos desde la superficie hacia el fondo, que pueden llegar a alcanzar los 600 m de profundidad (Clarke, M.R., Clarke, D.C., Martins y da Silva, 1996; Nakano y Stevens, 2008).

En cuanto a su reproducción, es una especie vivípara placentaria, con un período gestacional que va de 9 a 12 meses, luego del cual paren cerca de 30 crías de 35 a 50 cm de longitud, durante la primavera y principios del verano. Las zonas de cría se ubican en áreas de transición en donde abunda el alimento para los juveniles. La maduración de los ejemplares ocurre a los 4 a 6 años en los machos y a los 5 a 7 años en el caso de las hembras. Se ha constatado que las hembras adultas poseen un ciclo reproductivo estacional, mientras que machos y hembras subadultos son sexualmente activos todo el año (Nakano y Stevens, 2008).

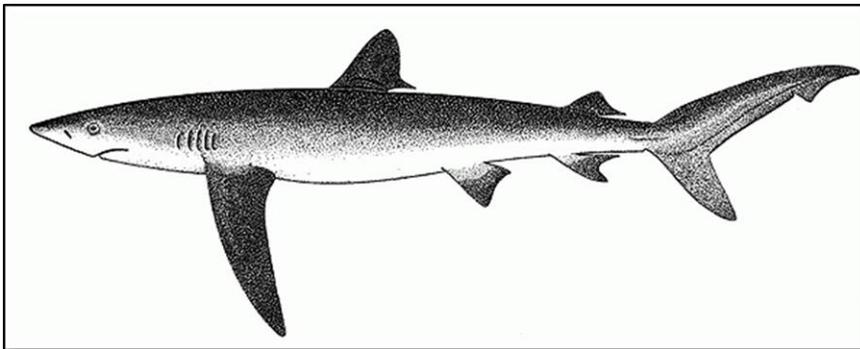


Figura 1: Tiburón azul (*Prionace glauca*). Fuente: FAO, 2018.

4.1.3. Distribución mundial

El tiburón azul es una especie oceánica epipelágica ampliamente distribuida en los océanos del mundo, entre 50°S y 60°N de latitud, aunque no exclusivamente (Fig. 2). Abunda en el Océano Pacífico oriental y en el Océano Atlántico, donde se concentra en montes submarinos (FAO, 1994; Nakano y Stevens, 2008).

Si bien prefiere aguas relativamente frías, entre 7 y 16°C, tolera muy bien las aguas templadas, tropicales y subtropicales que rondan los 20°C (Compagno, 1984; Nakano y Stevens, 2008).

Nakano y Stevens (2008) sugieren que la especie escasea en aguas ecuatoriales y aumenta con la latitud, y a su vez, que el tamaño disminuye a medida que aumenta la latitud.

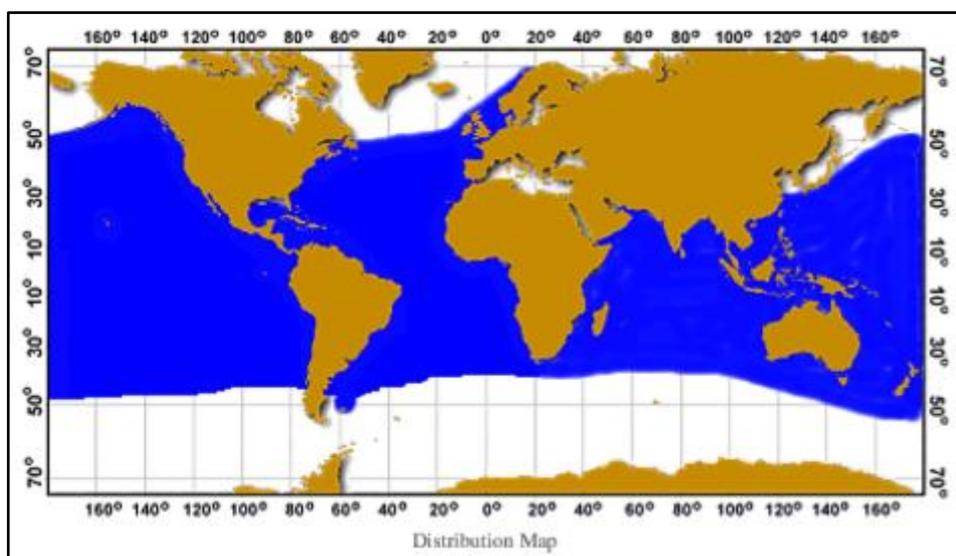


Figura 2: Mapa de distribución mundial. Fuente: FAO, 2018.

Debido a que es una especie con alta actividad migratoria, sigue patrones de movimiento complejos relacionados con la época del año, reproducción y disponibilidad de alimentos (Nakano y Stevens, 2008).

La migración de la especie varía según se encuentre en el Océano Pacífico o en el Océano Atlántico.

En el Océano Pacífico, el mercado de tiburón azul es muy limitado, pero se han registrado migraciones de hasta 9.200 km.

Basado en estudios de mercado, se proponen los siguientes modelos de migraciones según el sexo de los tiburones (Fig. 3 y Fig. 4) (Nakano y Stevens, 2008):

La especie se aparea en verano, a una latitud de entre 20 y 30°N. Las hembras preñadas viajan hacia el norte a la denominada zona de partos, donde permanecerán hasta el próximo verano, momento en que ocurren los nacimientos. Luego migran hacia la zona de cría, a una latitud de entre 35 y 45°N (límite subártico), en donde converge abundante disponibilidad de alimentos para el crecimiento de los jóvenes. Durante 2 a 5 años, hasta que alcanzan los 135 a 200 cm de longitud, las hembras

permanecen en la zona de cría, al norte de la misma y en el Golfo de Alaska (Fig. 3). En cambio, los machos, permanecen durante 2 a 4 años (hasta que alcanzan los 135 a 200 cm de longitud) en la zona de cría y al sur de la misma (Fig. 4). Finalmente, los adultos migran hacia la zona ecuatorial, al sur del área de cría.

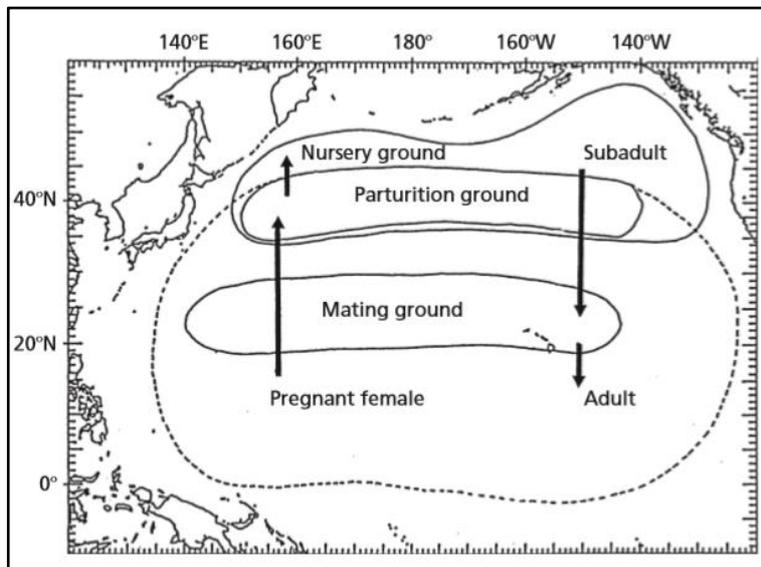


Figura 3: Mapa de migraciones de hembras de tiburón azul en el Pacífico norte (Nakano y Stevens, 2008).

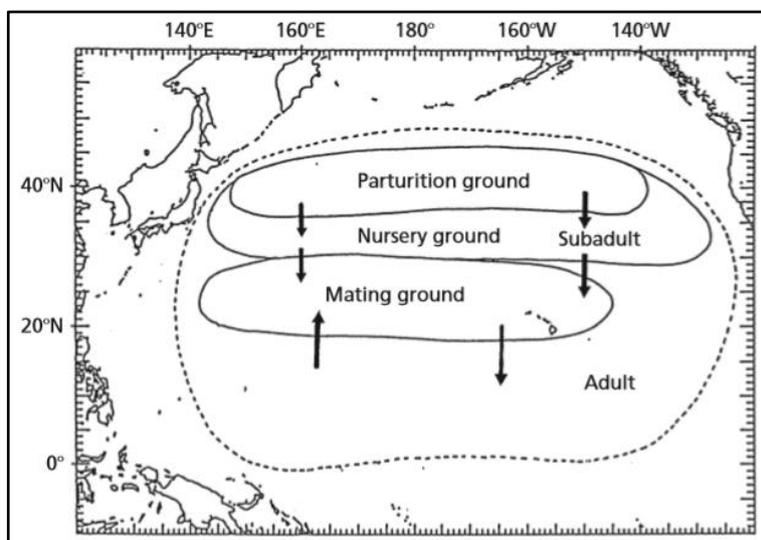


Figura 4: Mapa de migraciones de machos de tiburón azul en el Pacífico norte (Nakano y Stevens, 2008).

Nakano y Stevens (2008) se basan en estudios de mercado de tiburón azul para sugerir que se dan amplios movimientos migratorios transatlánticos que siguen los sistemas de corrientes oceánicas. En este sentido, establecen los siguientes modelos de migraciones según la época del año en el Océano Atlántico (Fig.5 y Fig. 6):

A fines de verano, otoño e invierno, los ejemplares jóvenes de ambos sexos, las hembras subadultas y los machos adultos, migran mar adentro siguiendo la Corriente del Golfo, algunos llegan hasta el Mar Caribe, otros incluso lo hacen hasta Sudamérica (Fig. 5). Las hembras recientemente apareadas se trasladan a la costa, mientras que algunos ejemplares migran hacia el Atlántico oriental.

Durante la primavera, migran hacia la costa desde la Corriente del Golfo, siguiendo la plataforma continental.

En invierno, las hembras adultas se ubican en el Atlántico oriental, en el área de las Islas Canarias y la costa africana, a unos 27 a 32°N; muchas de ellas son gestantes, mientras que más hacia el norte se encuentran los machos, hembras jóvenes y subadultos. Entre los 32 y 35°N se encuentra la zona de apareamiento, y se pueden hallar algunos machos inmaduros en alta mar. Las zonas de cría se encuentran en el Mar Mediterráneo y frente a la Península Ibérica, allí permanecen los tiburones jóvenes hasta alcanzar unos 130 cm de longitud, momento en el que se unen a las migraciones extensivas de los ejemplares adultos.

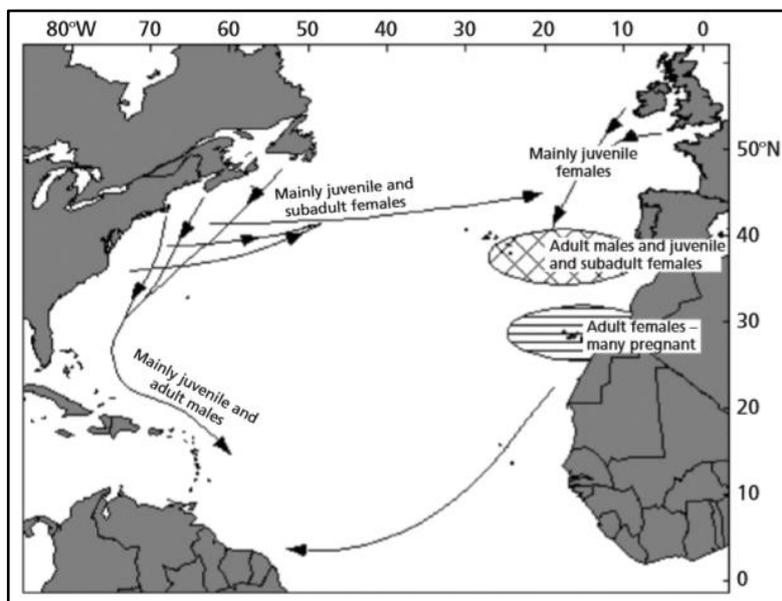


Figura 5: Mapa de migraciones de tiburón azul en el Atlántico norte durante otoño - invierno (Nakano y Stevens, 2008).

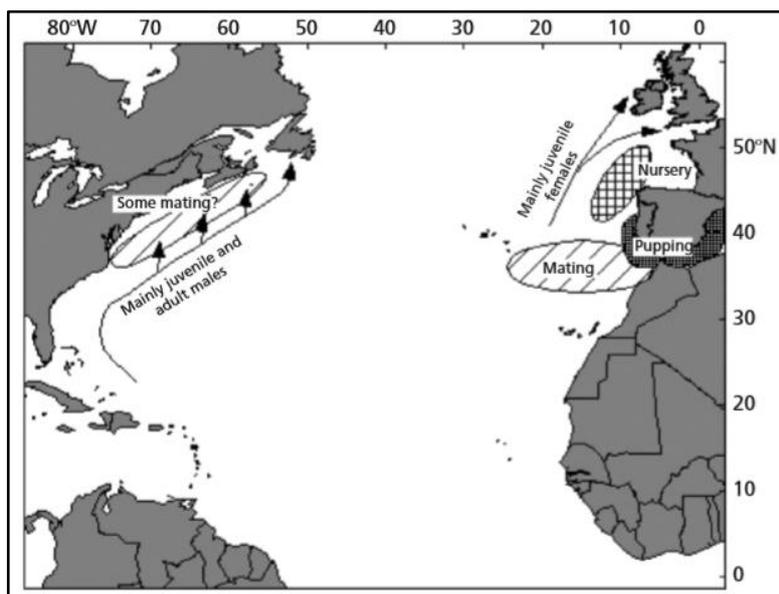


Figura 6: Mapa de migraciones de tiburón azul en el Atlántico norte durante primavera - verano (Nakano y Stevens, 2008).

4.1.4. Importancia comercial

La pesquería de palangre pelágico destinada a la captura de atunes y pez espada apresa en forma incidental una gran cantidad de tiburones oceánicos, siendo el tiburón azul la especie más capturada (Nion, 1999). A su vez, en el Océano Pacífico septentrional es capturado incidentalmente en la pesquería del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) con redes de deriva en las que queda atrapado mientras intenta atacar a los calamares gigantes. Eventualmente puede ser capturado con línea y anzuelo, arrastres pelágicos y arrastres de fondo (FAO, 1994).

En cuanto a la pesca intencional, el principal objetivo es la obtención de aletas para su consumo en sopas. Hong Kong y Guangzhou (China) son los mercados y centros de consumo de aleta de tiburón más grandes del mundo. China, incluyendo a Hong Kong, es el primer importador a nivel mundial de aletas de tiburón, y es el principal consumidor de sopa de aleta de tiburón. En 2020 se recolectaron y analizaron recortes de aletas de tiburón del mercado de aletas, arrojando como resultado que la especie más predominante es el tiburón azul, con una proporción de 36.11% en Guangzhou y de 39.01% en Hong Kong (Cardeñosa, Fields, Babcock, Shea y Feldheim, 2020).

En menor medida son explotados para consumo de su carne fresca, congelada, seca, salada o ahumada; cuyo obstáculo en la industria es su olor y sabor amoniacal originado en la descomposición de la urea.

Eventualmente son explotados para la obtención de aceite de hígado utilizado en la industria cosmética y farmacéutica por ser rico en vitamina A, vitamina D y escualeno; y ocasionalmente de sus dientes y vértebras para la producción de joyería y artesanías (Domingo et al., 2008; Kim, 2014).

Según FAO (2018) los países que consumen carne de tiburón azul con asiduidad son España, Brasil, Francia e Italia.

En la Tabla 2 se expresa la producción de captura global entre los años 2012 a 2016, siendo estos los últimos datos registrados por el organismo internacional Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

Tabla 2: Producción de captura global de Tiburón Azul (*Prionace glauca*) 2012 – 2016.

Año	Toneladas
2012	135.977
2013	139.485
2014	120.006
2015	105.937
2016	112.066

Fuente: FAO (2018)

4.1.5. Situación nacional

Desde el año 2002, el tiburón azul en presentación *HGT* (Headed, Guttled, Tailless) congelado es ingresado al país en régimen de admisión temporaria para su reprocesamiento. La procedencia de éste varía según los buques factoría, los buques chinos y taiwaneses capturan en el Océano Índico y los buques españoles en el Océano Atlántico y costa africana. Por su parte, el organismo que se encarga del control de los productos en admisión temporaria es el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) (Benítez et al., 2009).

En la Tabla 3 se expresan las toneladas y valores en miles de dólares de la exportación de tiburón azul en los últimos 5 años, desde Uruguay.

Tabla 3: Exportación de tiburón azul (*Prionace glauca*) en los últimos 5 años

Año	Miles USD	Toneladas
2015	10.928,00	5.199,00
2016	7.662,00	3.537,00
2017	9.890,00	4.359,00
2018	11.395,00	4.343,00
2019	8.275,00	2.939,00

Fuente: DINARA

En Uruguay, las plantas que reprocesan tiburón azul realizan la extracción de la piel del mismo (desollado o cuereado), lo cortan en trozos o rodajas y lo congelan IQF (Individual Quick Freezing) (Benítez et al., 2009).

Actualmente, las empresas que procesan tiburón azul en Uruguay son 5, de las cuales se pudo acceder a la información de 2 de ellas, como se expresa en la Tabla 4.

Tabla 4: Producción nacional de tiburón azul (*Prionace glauca*)

Planta	Volumen de producción anual (kg - 2018)	Presentaciones elaboradas	Cantidad de piel y restos de corte anual (kg - 2018)	Rendimiento (%) estimado*	Destino de la piel
1	899.478	Postas y lomos	171.329	83-85%	Bioterra**
2	1.761.118	Postas y lomos	360.711	83%	Bioterra**
Total	2.660.596		532.040		

*Rendimiento de pelado de tiburón HGT

**Bioterra: empresa dedicada a la recolección de residuos destinados a insumos para diversos procesos industriales.

Fuente: Crosi, comunicación personal.

4.1.6 Piel de tiburón azul

La piel del tiburón azul es gruesa, constituida por dos capas, con escamas presentes sólo en la capa superficial (Blanco, Vázquez, Pérez-Martín y Sotelo, 2017).

Las escamas placoides poseen una estructura similar a los dientes, con cavidad pulpar central, vasos sanguíneos, dentina y capa externa de esmalte (Pough et al., 1996; Durga et al., 2020). Dichas escamas cumplen la función de reducir la turbulencia causada por el flujo de agua sobre la superficie del animal, lo que aumenta la eficiencia en la natación y, además, le confieren una cubierta áspera que les brinda mayor flexibilidad y protección a las agresiones externas. Sumado a ello, la piel de las hembras es aproximadamente 3 veces más gruesa que la de los machos, lo que les permite soportar las mordeduras de éstos durante el cortejo (Compagno, 1984; Pough et al., 1996; Nakano y Stevens, 2008; Durga et al., 2020).

Por lo tanto, si se tiene en cuenta la naturaleza de las escamas y los mecanismos de acción de los equipos utilizados en la industria, es habitual que los residuos de la piel de tiburón azul no puedan ser procesados en forma de harina, motivo por el cual son desechados y enterrados tal cual fueron extraídos.

En cuanto a las propiedades físico químicas de la piel de tiburón azul, Rodríguez-Díaz, Kurozawa, Netto, y Hubinger (2011) establecieron que la piel de tiburón azul es una fuente importante de proteína, con un bajo contenido lipídico, lo que lo hace deseable para la separación de la fracción soluble en los hidrolizados. A su vez, el alto contenido de cenizas se justifica por la presencia de tejidos arrugados insolubles en la superficie de la piel, es decir, las escamas placoides (Tabla 5).

Tabla 5: Comparación de la composición química de piel de tiburón azul

Contenido (%)	R.D	L.I.M.S.A	S
Humedad	78,3 ± 1,0	78,9	76,03 ± 8,3
Cenizas	11,7 ± 0,4*	3,7	4,24 ± 2,4
Proteína	85,6 ± 0,4*	16,8	22,79 ± 9,7
Grasas	3,6 ± 0,4*	0,2	0,24 ± 0,3

R.D Rodríguez-Díaz et al. (2011).

L.I.M.S.A Laboratorio Industrial Montevideo (2011).

S Sousa, Vázquez, Pérez-Martín, Carvalho y Gomes (2017).

*Base seca.

4.2. Hidrolizados de pescado

En Uruguay, la tecnología de los hidrolizados de pescado fue desarrollada e investigada por el profesor Víctor H. Bertullo desde la década de 1950 hasta los años 70. En 1956, Bertullo y Pérez descubrieron una levadura proteolítica *Saccharomyces platensis* que actúa sobre el músculo de pescado (con el agregado de melaza como fuente energética) e hidroliza la molécula proteica a polipéptidos y aminoácidos libres. Asimismo, Víctor H. Bertullo aisló una levadura proteolítica de origen marino de la superficie del hígado de merluza (*Merluccius hubbsi*) y adaptada a un bios que resaltó sus propiedades proteolíticas, a la cual denominó *Hansenula monteideo*. Esta levadura es capaz de hidrolizar las proteínas de pescado en sus componentes básicos, es decir péptidos y aminoácidos (Bertullo, 1975).

Los hidrolizados (ensilados) de pescado se definen como proteínas de pescado que se descomponen en péptidos de diferente tamaño (Shan et al., 2013). El ensilado de pescado es un subproducto semilíquido o pastoso elaborado a partir de residuos de la industria pesquera, caracterizado por una alta digestibilidad y compuesto por proteínas de alto valor biológico, para el cual se requiere una metodología relativamente fácil y de bajo costo (Bello, 1994; Copes, Peciller, del Hoyo y García Romero, 2006).

El ensilado de desechos de pescado es una técnica antigua, amigable con el medio ambiente, segura y tecnológicamente más simple y económica que procesos como la producción de harina (Bertullo, 1975; Kim, 2014).

Durante el proceso se produce una disminución del pH a valores cercanos a 4, lo cual permite la activación de las enzimas propias del pescado, produciendo su autólisis. Como consecuencia se modifican características intrínsecas que inhiben el desarrollo de bacterias del deterioro y patógenas, esto le confiere al producto una conservación prolongada en el tiempo a temperatura ambiente (Copes et al., 2006).

La aplicación más importante que surge de los ensilados de pescado es su utilización como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas de especies productivas como cerdos, aves y peces (Bertullo, 1989). Benítez, Ibarz y Pagan (2008), sugirieron que una de las grandes aplicaciones de los hidrolizados de proteínas en humanos es su utilización como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas enterales destinadas a la alimentación de adultos enfermos y/o niños.

Los hidrolizados de pescado pueden ser obtenidos por diferentes métodos, dentro de los cuales se pueden mencionar: químico y biológico.

4.2.1 Hidrolizados químicos

El ensilado químico es un producto semilíquido obtenido de la mezcla de pescado entero o partes del mismo con un ácido o álcali. Generalmente se utilizan ácidos como el fórmico, clorhídrico, sulfúrico, propiónico o mezclas de ellos como por ejemplo acético y fórmico, fórmico y sulfúrico y propiónico y sulfúrico (Bello, 1994; Copes et al., 2006). A nivel químico, la utilización de ácido fórmico permite obtener ensilados de pH 4 a 4,5 y es capaz de impedir el crecimiento de microorganismos del deterioro sin necesidad de neutralización final. Los ácidos minerales como el clorhídrico o el sulfúrico son más económicos, su manipulación es más riesgosa, se utiliza menos cantidad y es necesaria la neutralización final del producto antes del consumo (Bello, 1994).

Copes et al. (2006) realizaron ensayos para obtener ensilados de pescado que les permitan desarrollar un suplemento dietario proteico de alto valor biológico para ser utilizado en microemprendimientos de acuicultura. Para los mismos utilizaron residuos de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) como ser cabezas, troncos y vísceras, así como filetes defectuosos y pescados enteros. El pescado fue picado con máquina manual (picadora de carne) y acidificado con 2,8% de ácido fórmico; se mezcló y se dejó 24 horas a temperatura ambiente para su posterior lectura de pH. Debido a que el ácido fórmico no fue suficiente para alcanzar un pH 4, debieron adicionar una solución de ácido sulfúrico al 20% gradualmente hasta llegar a un pH 4 que se mantuvo durante 30 días.

Pese a que es un método sencillo que no requiere equipos e infraestructura sofisticada, presenta importantes desventajas como un alto costo económico, riesgos para los operadores asociados a la manipulación de los ácidos y que los tratamientos químicos afectan la calidad nutricional de los péptidos obtenidos (Bello, 1994; Benítez et al., 2008).

4.2.2 Hidrolizados biológicos

4.2.2.1 Agentes microbianos

En busca de un método con mayores ventajas que el químico, surgen los hidrolizados con agentes microbianos.

Se han detectado grupos microbianos utilizados en el ensilaje, entre los cuales se señalan bacterias ácido-lácticas (BAL) como *Streptococcus lactis* y *Lactobacillus plantarum*; mohos y levaduras como *Aspergillus oryzae flavus*, *Saccharomyces platensis* y *Hansenula monteideo* (FAO, 1989).

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son un grupo heterogéneo de bacterias que crecen en presencia de oxígeno, y como vía de obtención de energía fermentan hidratos de carbono (glucosa y lactosa), dando como producto final ácido láctico (Schleger y Zaborosch, 1997).

Según Schleger y Zaborosch (1997) y Kuley et al. (2019), las BAL se clasifican en homofermentativas (dan como producto final ácido láctico puro o casi puro, hasta un 90%) y heterofermentativas (dan como producto final ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono).

Las BAL disminuyen los valores de pH hasta niveles menores a 4,5 impidiendo el crecimiento de otras bacterias anaeróbicas (Schleger y Zaborosch, 1997; Kuley et al., 2019). En ese sentido, respecto a la acción conservadora y esterilizante de dichas bacterias, se las utiliza frecuentemente en la industria alimenticia, por ejemplo, las BAL que se obtienen de materiales vegetales, poseen un elevado uso en la industria de alimentos de origen animal.

Con respecto a los requerimientos para el correcto desarrollo de las BAL, Hofvendahl y Hahn-Hagerdal (2000) recomiendan proporcionar el medio M.R.S (deMan, Rogosa, Sharpe Broth) debido a que son microorganismos cuya biosíntesis es muy limitada. A su vez, sugieren algunos parámetros de interés para que produzcan la fermentación, como una temperatura de entre 25 y 35°C, proporcionar sustratos energéticos como melaza y asegurarse de que el pH sea inferior a 5,7.

Una de las BAL más utilizada para producir ensilados de pescado es *Lactobacillus plantarum*, la misma es una bacteria gram positiva, no esporulada, homofermentativa, proveniente de plantas intactas y en descomposición (Schleger y Zaborosch, 1997).

La fermentación es un proceso microbiano con un impacto ambiental positivo; es la biotecnología más útil para resolver la utilización de los desechos de pescado en la industria de procesamiento del mismo, en parte porque los microorganismos constituyen una fuente inagotable de compuestos químicos útiles, se requiere una sencilla manipulación de los agentes, posee bajo costo económico y presenta la posibilidad de trabajar con diferentes cepas de BAL según disponibilidad (Bello, 1994; Singh nee Nigam y Pandey, 2009; Kuley et al., 2019).

En cuanto a los carbohidratos, son una fuente de nutrientes de carbono para el cultivo de los microorganismos, algunos de ellos, como la melaza, la sacarosa y el almidón, son utilizados casi universalmente como fuente de carbohidratos renovables en los procesos de fermentación, y su principal ventaja es que tienen un bajo costo económico (Singh nee Nigam y Pandey, 2009). La melaza puede ser obtenida de caña o de remolacha, y es un licor madre separado de la sacarosa cristalizada (Singh nee Nigam y Pandey, 2009).

Dos fenómenos independientes, pero estrechamente relacionados entre sí, dominan el proceso de ensilaje biológico. Por un lado, acidificación y reducción del pH por acción de las BAL, medible a través de la valoración de pH; y por otra parte hidrólisis por acción de las enzimas proteolíticas, medible a través de la consistencia, líquido exudado y compuestos nitrogenados.

Al aumentar la hidrólisis proteica, se producen compuestos nitrogenados (péptidos, aminoácidos, aminos, etc.) que afectan la capacidad buffer del medio, aumentando el pH y forzando a que las BAL produzcan mayor cantidad de ácido láctico para restaurar el pH del medio. Por ello la importancia de la disponibilidad de una fuente de energía para las bacterias (Bello, 1994).

Cuando el ácido láctico es dominante, se obtiene un ensilaje de muy buena calidad, debido a sus propiedades antimicrobianas y a su capacidad para disminuir el pH rápidamente, inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos y de putrefacción (Castillo, Sánchez y Ochoa, 2019; Kuley et al., 2019).

Víctor Bertullo, el precursor de los ensayos de hidrolizados de pescado a nivel nacional, experimentó principalmente con dos levaduras proteolíticas *Saccharomyces platensis* y *Hansenula montevideo* obteniendo ensilados de pescado estables a temperatura ambiente por largo tiempo (Bertullo, 1975).

Respecto a la aplicación de BAL, Areche, Berenz y León (1989) utilizaron bacterias del yogur *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* para producir la fermentación de residuos de sardina (*Sardina pilchardus*) con sacarosa (azúcar de caña). Los residuos de sardina (cabezas, vísceras y columna vertebral) se sometieron a cocción a 100°C durante 30 minutos. Algunas muestras se incubaron a 40°C por 48 horas y otras a temperatura ambiente (18°C a 28°C) durante 7 días. Para determinar la participación exclusiva de las bacterias del yogur en la fermentación, se esterilizaron los residuos de pescado y la sacarosa en autoclave a 115°C por 15 minutos y se mezclaron en condiciones asépticas con el inóculo del yogur. En paralelo se prepararon ensilados en condiciones normales, es decir, sin esterilizar, utilizándose la misma formulación y tiempo de incubación.

Por otro lado, Enrique Bertullo (1989) utilizó *Hansenula montevideo* con el fin de destinar los ensilados a la alimentación de cerdos. Para ello trabajó con “Vieja del Agua” (*Loricaria spp.*) que fue vertida en piletas y se le adicionó 15% de melaza y los cultivos líquidos de *Hansenula montevideo* al 0,1%; la mezcla se agitó diariamente de forma manual.

Basándose en los ensayos de Areche et al. (1989), Berenz (1994) sugirieron un ensilado biológico utilizando desechos del procesamiento de sardina (*Sardina pilchardus*) que fueron lavados, cocidos y molidos y posteriormente se les adicionó 5% de yogur y 10% de melaza.

Por su parte, Bello (1994) propuso ensayos con pescado entero y residuos de los mismos, con diferentes microorganismos como *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus*, *Candida lipolytica*, entre otros, y con sustratos como fuente de carbohidratos se utilizaron harina de maíz, yuca, almidón, avena y melaza. Durante este trabajo se realizaron diferentes pruebas para determinar las proporciones mínimas de sustrato e inóculo microbiano necesarios para desarrollar ensilados estables y viables. El progreso, la eficiencia y la estabilidad del proceso

fueron valorados a través de parámetros como acidez, pH, consistencia, nitrógeno no proteico, líquido exudado, humedad, grasa, proteína, cenizas y recuento de microorganismos.

En 2007, Dragonetti, Friss de Kereki, Fernández, Varela y Costa, siguiendo los lineamientos del Prof. Dr. Víctor Bertullo, desarrollaron ensilados biológicos de residuos de “caracol negro” (*Adelomenon brasiliense*) mediante la hidrólisis biológica con *Hansenula montevideo*. El preparado se mantuvo a temperatura ambiente (entre 18°C y 20°C) con agitación manual periódica. A las 12 horas evidenciaron una marcada fermentación y a las 48 horas obtuvieron un ensilado ácido de color y olor característico, estable a temperatura ambiente con un tenor proteico similar al de la materia prima (17% a 18%).

4.2.2.2 Enzimas

La hidrólisis enzimática es un tipo de hidrolizado biológico que utiliza enzimas para romper los enlaces peptídicos de las proteínas de desechos de productos frescos, por lo que son utilizadas luego del procesamiento (Kim, 2014).

Las enzimas más utilizadas para digerir los desechos de pescado son las proteasas. La hidrólisis enzimática presenta diferentes ventajas como ser la especificidad de acción de la enzima, lo que posibilita el control de las características en el producto final. Las condiciones de reacción suaves en las que tiene lugar la digestión de las proteínas permiten obtener un producto soluble de elevada calidad, ya que el músculo no es sometido a valores extremos de temperatura y pH, ni a la acción de compuestos químicos (disolventes orgánicos, bases o ácidos) que pudieran afectar el valor nutritivo del producto final. Por otro lado, la no destrucción de aminoácidos esenciales hace que la proteína retenga su valor nutritivo mejor que los hidrolizados ácidos y básicos (químicos) tradicionales. Y por último la inactivación de la enzima por calentamiento haciéndose innecesaria su eliminación del medio de reacción. Por todo ello, la hidrólisis enzimática aparece como una de las tecnologías más extendidas para la obtención de hidrolizados proteicos a partir de subproductos de la pesca (Aurrekoetxea y Perera, 2001).

Como antecedente de enzimas proteolíticas de origen vegetal utilizadas en ensilados de pescado, se pueden citar a la papaína y a la bromelina, obtenidas de frutas como la papaya y el ananá (Berenz, 1999).

En cuanto a las enzimas proteolíticas de origen animal utilizadas en la industria alimentaria, son proteasas pancreáticas, si bien cada vez están adquiriendo mayor importancia las de origen bacteriano o fúngico, principalmente las obtenidas a partir de los géneros *Bacillus* y *Aspergillus*. Los preparados de enzimas suelen ser mezclas de las mismas que generalmente se venden en estado líquido o en polvo. Las principales variables que determinan el resultado de la reacción son temperatura, pH, relación enzima/sustrato y tiempo de reacción. Los primeros 3 factores inciden en la velocidad de reacción y pueden afectar la especificidad de la enzima. El tiempo de reacción solamente determina el grado final de hidrólisis (Benítez et al., 2008).

Estas proteasas se clasifican según su origen, (animal, vegetal, bacteriano o fúngico) o según su modo de acción catalítica (endo- o exo-actividad). Las endoproteasas hidrolizan enlaces peptídicos dentro de la cadena de la proteína, y las exoproteasas, por el contrario, eliminan aminoácidos terminales de las proteínas (Benítez et al., 2008).

La temperatura del hidrolizado depende de la temperatura óptima de la proteasa utilizada, generalmente trabaja en un rango de 60 a 71°C; en cuanto al pH, la mayoría de las proteasas trabajan en valores cercanos a la neutralidad, condición que también existe en el organismo de los peces (Goldhor y Regenstein, 2007).

Actualmente, se encuentran disponibles comercialmente muchas proteasas de grado alimenticio; con respecto al valor económico, se puede afirmar que las endoproteasas son más económicas que las exoproteasas (Goldhor y Regenstein, 2007; Kim, 2014). Según Rao, Tanksale, Ghatge y Deshpande (1998), para este tipo de aplicaciones lo más adecuado consiste en la utilización de enzimas proteasas de origen microbiano frente a las de origen vegetal o animal, por su mayor estabilidad frente a la temperatura y pH, mayor rendimiento y menor costo de producción. Además, son de elección las enzimas con actividad endoproteasa, de manera que sean hidrolizados los enlaces peptídicos internos, dando lugar a péptidos de diferentes tamaños (Aurretkoetxea y Perera, 2001).

La hidrólisis enzimática de los desechos de la pesca ha recibido mayor atención en los últimos años debido a su eficacia en la recuperación de péptidos solubles con alto valor nutricional. Además, se han constatado posibles aplicaciones de los hidrolizados de proteínas para la prevención y el tratamiento de la hipertensión, la hipercolesterolemia, las alergias alimentarias y el cáncer debido a su actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina, su contenido de péptidos de bajo peso molecular y sus propiedades antioxidantes (Benítez et al., 2008; Rodríguez-Díaz, Tonon y Hubinger, 2014).

Aurretkoetxea y Perera (2001) preseleccionaron 4 enzimas comerciales en función del tipo de actividad (endoproteasas), referencias bibliográficas y recomendaciones de los propios fabricantes. Los ensayos se realizaron con residuos túridos cocidos y diferentes concentraciones de enzima: 1%, 3% y 5%. Una vez obtenido el hidrolizado, se lo sometió a secado en estufa a vacío a 90°C.

Por su parte, Rodríguez-Díaz et al. (2011) realizaron hidrolizados enzimáticos de piel de tiburón azul congelada con algo de carne adherida y una endoproteasa comercial: Protamex (Novozymes). Los experimentos se realizaron en diferentes condiciones, pH 6.8 a 8, relación enzima/sustrato 1% a 5% y temperatura 45 a 65°C. Una vez añadida la enzima, mantuvieron el pH constante mediante la adición de 1 N de NaOH. Finalmente llevaron la mezcla a 90°C durante 10 minutos a fin de inactivar la enzima.

En 2019, Calle y Gutiérrez propusieron hidrolizados por método enzimático en calamar gigante (*Dosidicus gigas*) con una enzima comercial: DELVOLASE®. Se realizó la molienda de la materia prima y se le adicionó agua y 3,2% de la enzima. Se inactivó la enzima elevando la temperatura hasta 90°C por 10 minutos y finalmente el hidrolizado resultante se sometió a secado por aspersion con el objetivo de deshidratarlo.

5. HIPÓTESIS

Se pueden obtener hidrolizados de piel de tiburón azul (*Prionace glauca*) mediante la acción de inóculos de *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™* (CL3052) así como por el uso de una enzima comercial: FPH (Novozymes) como tecnologías para aprovechar los residuos de la misma.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Comparar dos métodos de degradación biológica: *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™* y enzima comercial: FPH (Novozymes) como agentes productores de hidrolizados de piel de tiburón azul (*Prionace glauca*).

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener hidrolizados con la piel de tiburón azul (*Prionace glauca*) utilizando *Lactobacillus plantarum*.
- Obtener hidrolizados con la piel de tiburón azul (*Prionace glauca*) empleando una enzima comercial (proteasa).
- Determinar la composición química de los dos tipos de hidrolizados.
- Explorar la posibilidad de que estos procesos sean utilizados en la industria pesquera nacional.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de la Unidad Académica de Ciencia y Tecnología de Productos Pesqueros, ex Instituto de Investigaciones Pesqueras “Prof. Dr. Víctor H. Bertullo” (Udelar – Facultad de Veterinaria).

Se utilizó piel de tiburón azul (*Prionace glauca*) provista por dos plantas procesadoras ubicadas en los Departamentos de Montevideo y Lavalleja, Uruguay. La misma se transportó al laboratorio congelada en bolsas plásticas y se almacenó en freezer (-18°C) hasta su posterior procesamiento.

Se realizaron dos ensayos con repeticiones: uno con *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™* (CL3052) con tratamientos experimentales 5%, 10% y 15% y otro con una enzima comercial FPH (Novozymes) con tratamientos experimentales 0,33% y 0,5%. Se estudió la acción de estos agentes sobre el sustrato (piel de tiburón), controlando diariamente pH, temperatura y características de la piel de tiburón azul (grado de degradación a la inspección visual).

Por otro lado, se realizó una encuesta a los veterinarios responsables de todas las plantas procesadoras de piel de tiburón azul habilitadas al momento de este estudio, con el fin de recabar información de la situación y equipamiento actual para la posible producción de hidrolizados en dichas plantas.

A fin de evaluar los cambios físico-químicos como consecuencia del uso de estos procesos, se realizaron análisis de composición química de la materia prima y de los dos tipos de hidrolizados obtenidos con *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™* (CL3052) y con la enzima comercial FPH Novozymes. Los mismos fueron realizados en el laboratorio del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de Facultad de Química (Udelar) y en el Laboratorio Cristar Zerbi.

7.1. Reconstitución de cepas liofilizadas de *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™* (CL3052) y cultivo starter

Se rehidrató el loop en un tubo de ensayo con 1 ml de Tryptic Soy (T.S.) y se incubó durante 20 minutos a 36°C (hasta la completa disolución de su capa protectora y liberación de las bacterias). Posteriormente se inoculó en 500 ml de caldo de Man Rogosa Sharpe Broth (M.R.S. Broth) según protocolo “Stock Culture Maintenance” (Anexo I) recomendado por ATCC®, obteniendo así el cultivo starter (el caldo M.R.S Broth es selectivo y específico para *Lactobacillus*).

Finalmente, se incubó en estufa de cultivo (Daihan Scientific ThermoStable IG - 50) a 37°C durante 48 horas para lograr el desarrollo bacteriano en el medio.

Del cultivo starter se tomaron 10 ml con micropipeta y se colocaron en 90 ml de agua peptonada (100 ml total), posteriormente se realizaron diluciones en base 10 y por duplicado. Las diluciones 10^{-8} y 10^{-9} se inocularon en placas estériles en profundidad con deMan Rogosa Sharpe Agar (M.R.S Agar) y se incubaron a 37°C durante 48 horas para el posterior recuento de colonias, lo que permitió medir la concentración bacteriana del inóculo. Finalmente se realizó la medición por turbidimetría con escala estándar de Mc Farland, para la cual se colocaron 2 ml de agua destilada en un tubo de ensayo, posteriormente se tomaron dos colonias de una de las placas sembradas en (M.R.S Agar), y con ansa se colocaron en el tubo de ensayo. Luego se agitó y se

midió con la escala Mc Farland obteniendo un inóculo cuya concentración bacteriana fue de $1,5 \times 10^8$ células/ml (estándar 5).

7.2. Ensayo con *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™* (CL3052)

Se trabajó con 8 muestras que fueron divididas en 3 submuestras y se prepararon de la siguiente manera:

Se cortó la piel de tiburón azul en trozos y se colocó 0,500 kg en cada uno de los 3 vasos de Bohemia. Posteriormente se adicionó 15% v/v de melaza y 15% v/v de agua destilada a cada uno y se agitó con varilla para homogeneizar.

En uno de los vasos de Bohemia, se colocaron 25 ml (5%) del inóculo (*L. plantarum* en medio M.R.S Broth); en el segundo se adicionaron 50 ml (10%) del inóculo (*L. plantarum* en medio M.R.S Broth); y en el tercero se colocaron 75 ml (15%) del inóculo (*L. plantarum* en medio M.R.S Broth). Posteriormente se homogeneizó y se midió el pH inicial.

Finalmente se llevaron las muestras a estufa a 36°C y se midieron los parámetros de interés diariamente (pH y grado de degradación a inspección visual).

Los ensayos se incubaron en estufa a 36°C durante 12 días controlando periódicamente el proceso de degradación y parámetros de interés.

Como control en cada ensayo se utilizó un vaso de Bohemia con 0,500 kg de piel de tiburón azul, 15% de melaza y 15% de agua destilada. El mismo se mantuvo en estufa a 36°C durante su viabilidad.

7.3. Ensayo con enzima comercial FPH (Novozymes)

Se trabajó con 2 muestras de piel de tiburón azul que fueron divididas en 4 submuestras y se prepararon de la siguiente manera:

En cada muestra se cortó la piel de tiburón en trozos y se colocó 0,500 kg en cada vaso de Bohemia de vidrio (4 en total).

En 2 de los vasos se agregaron 0.5 litros de agua destilada y en los otros 2 se agregó 1 litro de agua destilada.

Posteriormente se llevó a 85°C durante 10 minutos y se dejó enfriar hasta alcanzar 50°C, para luego inocular 5,0 ml de enzima en cada vaso, lo que corresponde a 0,33% y 0,5% de enzima en los vasos de Bohemia de 1 litro y 0.5 litros de agua destilada respectivamente.

Se agitó mecánicamente y se midió el pH inicial.

Posteriormente se llevó a estufa a 55°C por 24 horas y se midió pH e índice de refracción con refractómetro (Atago® – Master Refractometer). Finalmente se mantuvo a temperatura ambiente controlando los parámetros de interés.

7.4. Recolección de datos

El instrumento de recolección de datos utilizado está representado en el Anexo II.

Todas las variables de respuesta se midieron durante 12 días, las mismas fueron:

pH: se midió diariamente con pHmetro (Atago® Digital pH Meter), se sumergió el instrumento en cada hidrolizado y se anotaron los valores, entre cada medición se lavó el instrumento con agua destilada.

En los tratamientos experimentales con *L. plantarum*, se buscó llegar a valores iguales o inferiores a 4,5 (Kuley et al., 2019; Castillo et al., 2019). En el caso de enzima comercial, se esperaron valores cercanos a 6, según recomendaciones del laboratorio de origen (Novozymes).

Índice de refracción: en el caso de los ensayos con enzima comercial, se midió el índice de refracción con refractómetro. Para ello se tomó una muestra de cada hidrolizado con pipeta, y se colocó en la cámara del refractómetro para la lectura del valor correspondiente. Los valores esperados para los hidrolizados son ≥ 8 °Brix, lo que indicaría la máxima concentración de sólidos en el medio.

Olor: se registró diariamente la percepción olfativa mediante escala de intensidad de olor ordinal, a saberse:

1. Sui generis
2. Fermento
3. Amoniacal suave
4. Amoniacal fuerte
5. Pútrido

Sobrenadante: se comprobó ausencia o presencia de sobrenadante mediante observación visual, el cual se registró en el cuadro "Observaciones" de la planilla de recolección de datos, y se midió con la siguiente escala:

- 0 Ausencia
- 1 Escaso
- 1,5 Intermedio
- 2 Moderado
- 2,5 Abundante

Sedimento: se comprobó ausencia o presencia de sedimento mediante observación visual, el cual se registró en el cuadro "Observaciones" de la planilla de recolección de datos y se midió con la siguiente escala:

- 0 Ausencia
- 1 Escaso
- 1,5 Intermedio
- 2 Moderado
- 2,5 Abundante

Grado de degradación: se comprobó el grado de degradación mediante observación visual, el cual se registró en el cuadro “Observaciones” de la planilla de recolección de datos y se midió con la siguiente escala:

- 0 Ausencia
- 1 Escaso
- 1,5 Intermedio
- 2 Moderado
- 2,5 Abundante
- 3 Completo

7.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos para la variable pH se realizó mediante test de Kruskal-Wallis y test de U Mann-Whitney. Para determinar la normalidad de los datos, se utilizó el test de Shapiro-Wilk. Cabe destacar, que dichos análisis se realizaron con el software estadístico Past.

Por otra parte, los datos de degradación de los hidrolizados con *Lactobacillus plantarum* se analizaron mediante un test no paramétrico, el Análisis de Varianza para medidas repetidas de Friedman seguido, cuando se encontraron diferencias significativas, del test de Nemenyi. Para ambos test se consideró un nivel de significación del 5% ($\alpha=0,05$).

8. RESULTADOS

8.1. pH

En comparación con las muestras tratadas con *Lactobacillus plantarum*, las muestras adicionadas con enzima comercial no mostraron variaciones de pH, las mismas respetaron un valor constante de 6 (Fig. 7).

A su vez, de las muestras tratadas con *Lactobacillus plantarum*, la que presentó menor variación de valores de pH es la que trabajó con un inóculo de 10%, obtuvo un promedio de $4,22 \pm 0,12$, y un valor mínimo de 4,09 y un máximo de 4,40.

Respecto a las muestras tratadas con un 15% de inóculo, obtuvieron un valor mínimo de 4,03 y un máximo de 4,75; con un promedio de $4,24 \pm 0,24$. Finalmente, las muestras tratadas con inóculo 5% presentaron un promedio de $4,68 \pm 0,61$, un valor máximo de 6,05 y un mínimo de 4,33.

Por su parte, las variaciones de pH fueron afectadas por el grupo, las muestras tratadas con inóculo del 5% presentaron una diferencia significativa de $p=0,013$ en comparación con el inóculo 10% y de $p=0,027$ en comparación con las muestras tratadas con el inóculo 15%.

Además, no existió diferencia significativa entre las muestras tratadas con inóculo 10% y 15% ($p=0,83$).

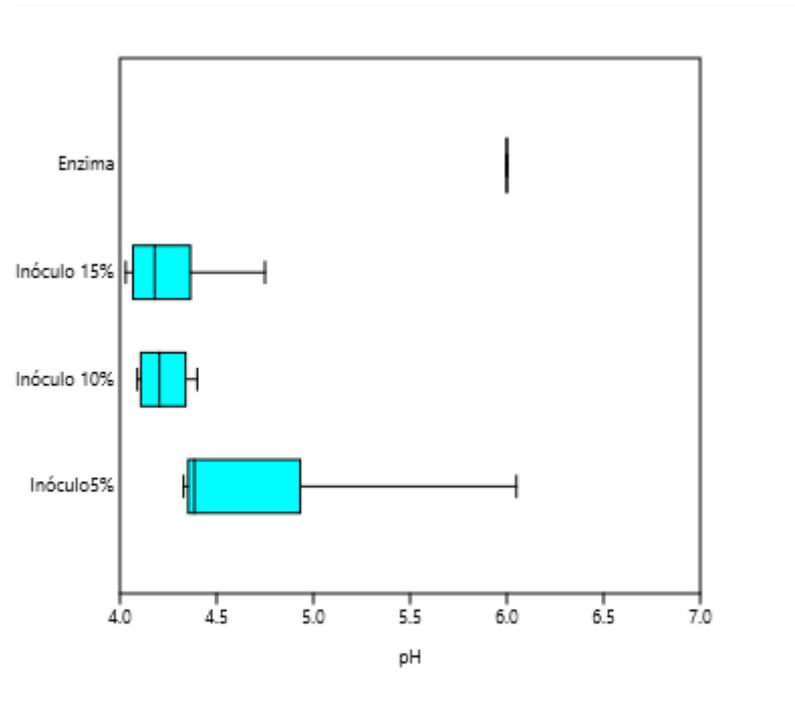


Figura 7: Cambios de pH en ensayos con *Lactobacillus plantarum* y enzima comercial.

8.2. Inspección de las muestras

8.2.1. Ensayos con *Lactobacillus plantarum*

Del análisis de la inspección puede desprenderse que el inóculo 10% y el inóculo 15% se comportan físicamente igual.

La muestra control debió desecharse por el grado de putrefacción, pero se observa que mientras se mantuvo viable, no alcanzó los parámetros que alcanzaron las muestras inoculadas con *Lactobacillus plantarum*.

Con respecto a las muestras inoculadas con un 5%, las mismas tienden a mantener niveles menores a los observados con muestras 10% y 15%.

1. Olor

El primer día las muestras presentaron un olor amoniacal fuerte que fue disminuyendo conforme al transcurso del tiempo, ya desde el cuarto día en adelante el olor era a fermento (Tabla 6).

En cuanto al control, el primer día presentó un olor amoniacal fuerte, que fue tornándose desagradable y putrefacto, hasta el cuarto día en que se descartó debido a su putrefacción.

Tabla 6: Evolución diaria del olor en muestras inoculadas con *Lactobacillus plantarum* y control

	Muestras	Control
Día 1	4	4
Día 2	3	5
Día 3	3	5
Día 4	2	*
Día 5	2	*
Día 6	2	*
Día 7	2	*
Día 8	2	*
Día 9	2	*
Día 10	2	*
Día 11	2	*
Día 12	2	*

(*) El control se descartó debido a su putrefacción.

2. Comportamiento físico

Pudo establecerse que todas las muestras presentaron el mismo nivel de sobrenadante durante el desarrollo de los hidrolizados, y que las muestras inoculadas con 10% y 15% de *Lactobacillus plantarum* presentaron mayor cantidad de sedimento en comparación con las muestras tratadas con 5% de inóculo (Fig. 8 y Fig. 9). El mismo era negro, de aspecto arenoso brillante.

En cuanto al hidrolizado, desde el día 7 se alcanzó el mayor grado de degradación en las muestras tratadas con 10% y 15% de inóculo, el cual se mantuvo hasta el descarte de las mismas. Por su parte, las muestras tratadas con inóculo 5%, desarrollaron un grado de degradación sustancialmente menor al alcanzado por los inóculos 10% y 15% (Fig. 10). A su vez, existió diferencia significativa entre el inóculo 5% y los inóculos 10% y 15%, pero no existió diferencia significativa entre los inóculos 10% y 15% (Tablas 7 y 8).

Tabla 7: Comparación de la degradación lograda cada día en los hidrolizados de piel de tiburón azul con diferentes dosis de inóculo (*Lactobacillus plantarum*)

Día	5%	10%	15%	Nivel de significación
1	8	8	8	n.s.
2	8	8	8	n.s.
3	16 ^a	31 ^b	33 ^b	p<0,05
4	16 ^a	31 ^b	33 ^b	p<0,05
5	16 ^a	40 ^b	40 ^b	p<0,05
6	16 ^a	40 ^b	40 ^b	p<0,05
7	16 ^a	47 ^b	46 ^b	p<0,05
8	16 ^a	48 ^b	47 ^b	p<0,05
9	16 ^a	46 ^b	48 ^b	p<0,05
10	16 ^a	47 ^b	47 ^b	p<0,05
11	16 ^a	47 ^b	48 ^b	p<0,05
12	16 ^a	48 ^b	48 ^b	p<0,05

Se muestran los rangos acumulados de las ocho repeticiones para cada día.

Los datos fueron analizados mediante el Test de Friedman seguido del Test de Nemenyi ($\alpha=0,05$).

En la misma línea, letras iguales implican no diferencias significativas ($p>0,05$), mientras que letras diferentes implica diferencias significativas ($p<0,05$) entre esos tratamientos experimentales.

Tabla 8: Estudio de la evolución diaria (siete días) de la degradación lograda en los hidrolizados de piel de tiburón azul con diferentes dosis de inóculo (*Lactobacillus plantarum*)

Dosis	Días						
	1	2	3	4	5	6	7
5%	8 ^a	8 ^a	16 ^b				
10%	8 ^a	8 ^a	31 ^b	31 ^b	40 ^c	40 ^c	47 ^d
15%	8 ^a	8 ^a	33 ^b	33 ^b	40 ^c	40 ^c	46 ^d

Se muestran los rangos acumulados de las ocho repeticiones para cada dosis comparándolos a lo largo de los primeros siete días del estudio.

Los datos fueron analizados mediante el Test de Friedman seguido del Test de Nemenyi ($\alpha=0,05$).

En la misma línea, letras iguales implican no diferencias significativas ($p>0,05$), mientras que letras diferentes implica diferencias significativas ($p<0,05$) entre esos tratamientos experimentales.

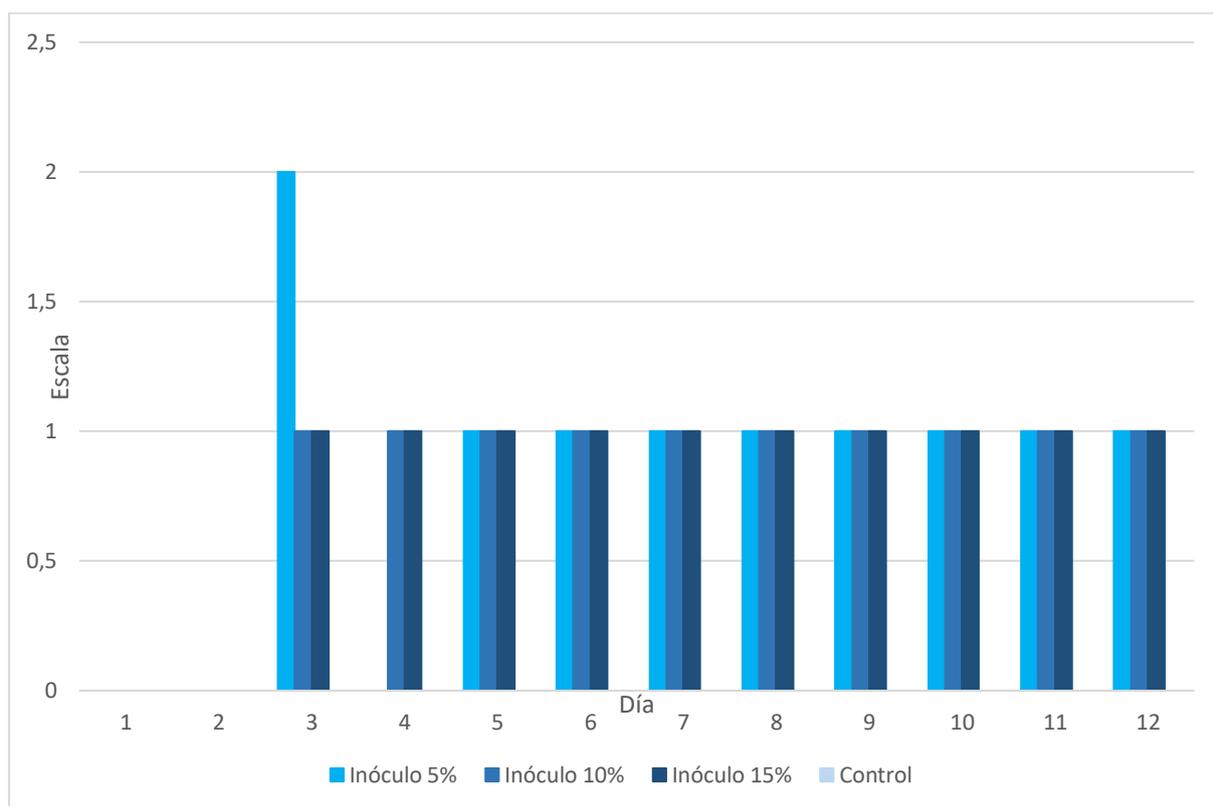


Figura 8: Evolución del sobrenadante en las diferentes muestras.

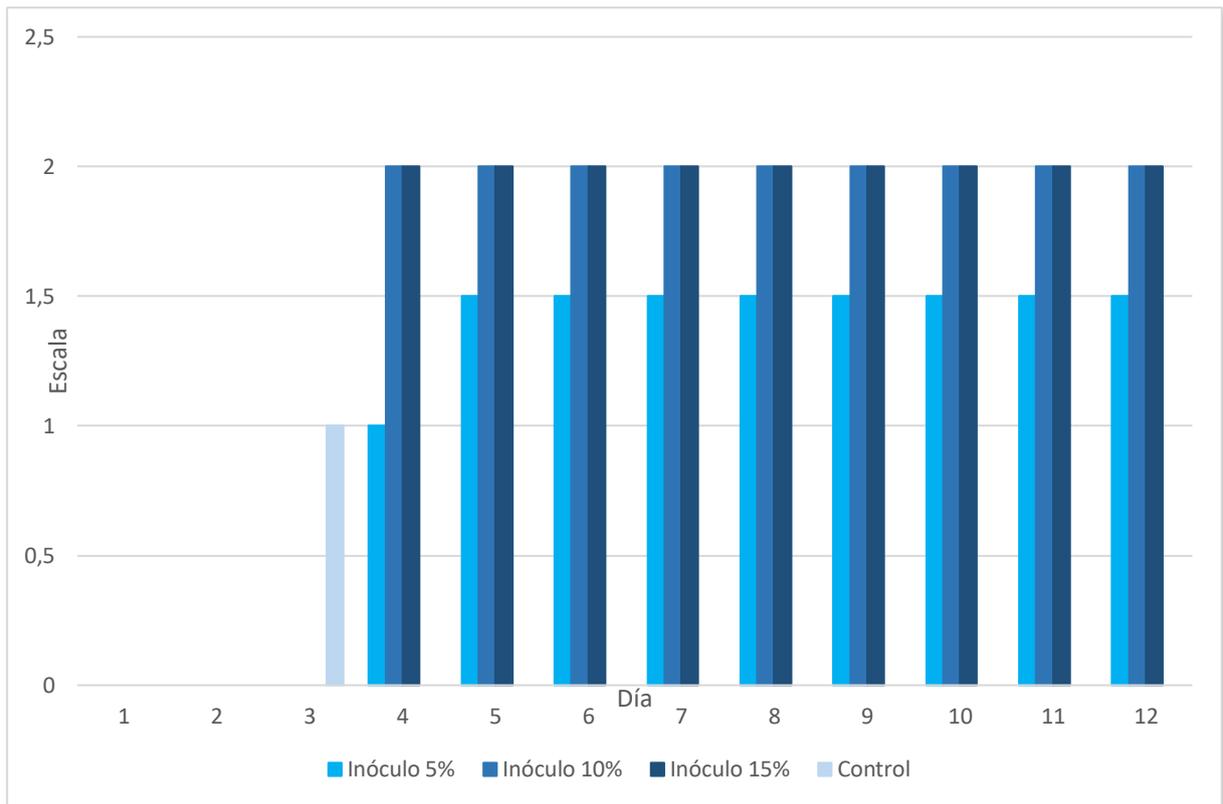


Figura 9: Evolución del sedimento en las diferentes muestras.

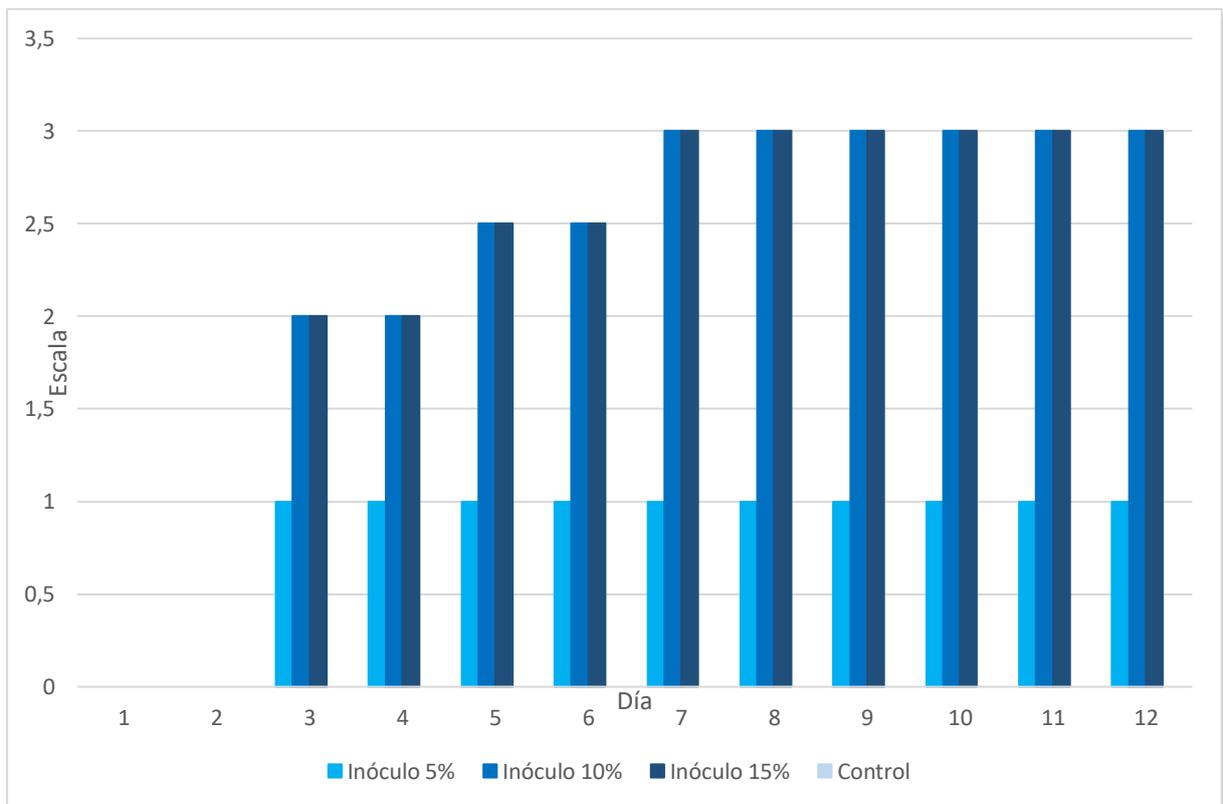


Figura 10: Evolución del grado de degradación en las diferentes muestras.

8.2.2. Ensayos con enzima comercial

1. Olor

El primer día las muestras presentaron un olor amoniacal fuerte correspondiente a 4 escala ordinal de intensidad de olor, a partir del segundo día, el olor se tornó amoniacal suave.

2. Comportamiento físico

Luego de una incubación a 55°C durante 24 horas, las muestras se encontraban completamente hidrolizadas, de aspecto líquido, color ámbar claro, y con abundante sedimento negro brillante.

3. Índice de refracción

Las muestras con volumen de 500 ml presentaron mayor índice de refracción, es decir, mayor porcentaje de sólidos en la muestra. En cambio, en muestras de 1000 ml, si bien disminuyen los valores de índice de refracción, se mantienen dentro de los parámetros esperados (≥ 8 °Brix) para los hidrolizados (Tabla 9).

Tabla 9: Medición de índice de refracción en las diferentes muestras

Submuestra	Volumen agua (ml)	°Brix
SM1	500	13
SM2	500	12
SM3	1000	8,5
SM4	1000	8
SM5	500	12
SM6	500	10
SM7	1000	8
SM8	1000	8

8.3. Hidrolizados

Respecto al tiempo requerido para la completa degradación de la materia prima, es considerablemente menor al emplear la enzima comercial en comparación con la aplicación de *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™*, con un tiempo de 24 horas contra 7 días respectivamente.

En cuanto a la matriz, los hidrolizados obtenidos con *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™* eran pastosos de color marrón oscuro, mientras que por acción de la enzima comercial FPH (Novozymes) se obtuvieron hidrolizados líquidos de color ámbar claro con sedimento negro brillante.

8.4. Composición química proximal

Tabla 10: Composición química proximal de los diferentes ensayos

g/100 g	Piel	Hidrolizado enzima 0.5%	Hidrolizado bacteria 10%
Humedad	(30 ± 0,6)	(90,44 ± 0,6)	(69,5 ± 2,6)
Cenizas	(5,2 ± 0,3)	(0,64 ± 0,01)	(10,5 ± 0,1)
Proteína	(27,08 ± 0,3)	(10,5 ± 0,6)	(19,5 ± 2,9)
Grasas	< 0,10	-	0,10

Nota: los datos se presentan con sus respectivos desvíos estándar. Los análisis fueron realizados en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de Facultad de Química (Udelar) y en el Laboratorio Cristar Zerbi.

Se obtuvo un rendimiento proteico de 72% en el hidrolizado microbiano y de 38,77% en el hidrolizado enzimático.

8.5. Encuesta

La encuesta realizada a los veterinarios responsables de todas las plantas procesadoras de piel de tiburón azul habilitadas al momento de este estudio arrojó que 4 de los 5 encuestados considera que el método de hidrolizado por enzima comercial sería el más aplicable en la industria pesquera uruguaya.

A su vez, solo 1 de los encuestados cuenta con los equipos necesarios para llevar a cabo dicho procedimiento, pero los 5 estarían dispuestos a invertir en los recursos necesarios para desarrollar la tecnología si la misma presenta menor costo económico que el actual método de disposición de residuos (Anexo III).

A partir de las encuestas surgió un gran interés por determinar si el costo de producir hidrolizados compite con el costo de la actual disposición de residuos. En ese sentido, se comenzaron averiguaciones para llegar a la información, que resultan en lo siguiente:

Disposición de residuos para compostaje:

Empresa: USD 7 / tonelada
Flete: USD 15 / tonelada
Total: USD 22 / tonelada

(Benítez, comunicación personal)

Hidrolizado con enzima FPH (Novozymes):

USD 719,8 / tonelada

(Uval, comunicación personal)

9. DISCUSIÓN

Los residuos de piel de tiburón azul (*Prionace glauca*) suponen una problemática para la industria pesquera nacional, ya que, debido a la naturaleza de sus escamas y al mecanismo de acción de los equipos industriales, no puede ser procesada en forma de harina, por lo que debe ser desechada y enterrada tal cual fue extraída.

En ese sentido, el presente estudio desarrolló hidrolizados a partir de dichos residuos, empleando y comparando dos formas de degradación biológica: *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™* y enzima comercial FPH (Novozymes).

En los ensayos realizados con *Lactobacillus plantarum*, fueron significativamente más eficientes los inóculos de 10% y 15%, siendo los mismos completamente degradados desde el día 7, donde se logró un hidrolizado pastoso, de color marrón oscuro y olor a fermento. En cuanto a los ensayos realizados con enzima comercial, a las 24 horas se obtuvo la completa hidrólisis resultando en un hidrolizado líquido, color ámbar claro y de olor amoniacal suave. Cabe destacar que, en ambos casos, los hidrolizados presentaron sedimento negro brillante que se corresponde con las escamas de la piel de tiburón.

En términos de pH, las muestras adicionadas con enzima comercial no presentaron variaciones, respetaron un valor constante de 6, siendo este el esperado según las recomendaciones del laboratorio de origen. En comparación con el pH de 7,1 obtenido en el trabajo de Rodríguez-Díaz et al. (2011), quienes también utilizaron como sustrato piel de tiburón azul, es posible asociar esa diferencia a las distintas enzimas utilizadas en ambos trabajos.

Por su parte, en cuanto a las muestras inoculadas con *Lactobacillus plantarum*, las variaciones de pH fueron afectadas por el grupo, las muestras tratadas con inóculo del 5% presentaron una diferencia significativa de $p=0,013$ en comparación con el inóculo 10% y de $p=0,027$ en comparación con las muestras tratadas con el inóculo 15%. Por otro lado, no hubo diferencia significativa entre las muestras tratadas con inóculo 10% y 15% ($p=0,83$). A su vez, de las muestras tratadas con *Lactobacillus plantarum*, la que presentó menor variación de valores de pH es la que trabajó con un inóculo de 10%, obtuvo un promedio de $4,22 \pm 0,12$, y un valor mínimo de 4,09 y un máximo de 4,40. Respecto a las muestras tratadas con un 15% de inóculo, obtuvieron un valor mínimo de 4,03 y un máximo de 4,75; con un promedio de $4,24 \pm 0,24$. Finalmente, las muestras tratadas con inóculo 5% presentaron un promedio de $4,68 \pm 0,61$, un valor máximo de 6,05 y un mínimo de 4,33. En ese sentido, es posible asociarlo con la producción de ácido láctico por parte de *Lactobacillus plantarum*, el cual disminuye el pH rápidamente inhibiendo el desarrollo de microorganismos patógenos (Kuley et al., 2019; Castillo y col, 2019). Además, los resultados coinciden con lo establecido por Schleger y Zaborosch (1997) y Kuley et al. (2019), quienes afirman que las BAL disminuyen los valores de pH hasta niveles menores a 4,5.

Se comprobó que al emplear *Lactobacillus plantarum*, se obtiene el hidrolizado esperado con inóculos de 10% y 15%, logrando las características deseadas con una menor variación de pH en el tiempo el inóculo de 10%. Esto puede compararse con el resultado obtenido por Bello (1994), quien determinó como agente más eficiente y recomendable *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™* a una concentración de 1 a 5%. Cabe destacar que la materia prima utilizada por Bello (1994) es pescado entero, ello facilita el proceso de hidrólisis teniendo en cuenta que en el presente estudio se

utilizó materia prima de compleja degradación.

En cuanto al sustrato energético para las bacterias, la proporción de melaza de un 15% sugerida por Bello (1994) y Bertullo (1989) demostró ser suficiente para obtener los hidrolizados en el presente trabajo.

Además, se comprobó que no es necesaria la cocción de la materia prima a 100°C durante 30 minutos como sugieren Areche et al. (1989), ya que la disminución de pH por acción del ácido láctico producido por *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™* inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos y del deterioro (Kuley et al., 2019; Castillo y col, 2019).

Por su parte, Bertullo (1989) utilizó como inóculo una levadura marina proteolítica, *Hansenula montevideo* en un porcentaje de 0.1 %, siendo éste sustancialmente menor al utilizado en este trabajo, con un inóculo ideal de *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™* de 10% y 15%. Si bien Bertullo (1989) logró una completa hidrólisis a temperatura ambiente (18°C a 20°C), en el presente estudio la cepa utilizada es incapaz de trabajar en esas condiciones, necesitando 36°C de temperatura de incubación.

El diseño planteado para los ensayos con enzima comercial permitió establecer que los resultados óptimos de hidrolizado se obtienen al utilizarla adicionada al 0,5%. Este valor es considerablemente menor al que sugieren Aurretkoetxea y Perera (2001), que es de 5% y también menor al que plantean Calle y Gutiérrez (2019) de 3,2%, esto puede deberse a la diferencia en las enzimas utilizadas en los diferentes trabajos. En cuanto a la relación agua/materia prima, Calle y Gutiérrez (2019) sugieren una parte de agua cada dos partes de materia prima, en cambio los mejores resultados en estos ensayos se obtuvieron con una relación 1:1.

Con respecto al tiempo requerido para el método enzimático, en comparación con el trabajo de Aurretkoetxea y Perera (2001), quienes lograron el hidrolizado enzimático en 30 minutos, el tiempo empleado en el presente estudio es mayor (24 horas). Esto puede deberse a que la materia prima que utilizaron Aurretkoetxea y Perera (2001) son residuos cocidos, lo que facilita la hidrólisis enzimática, y a su vez, la enzima que utiliza es diferente a la empleada en el presente estudio.

En cuanto al hidrolizado obtenido con enzima comercial, la composición fue humedad 90,44 ± 0,6%, proteínas 10,5 ± 0,6% y cenizas 0,64 ± 0,01%. El trabajo de Rodríguez-Díaz et al. (2011) con piel de tiburón azul obtuvo la siguiente composición química: humedad 94,8 ± 0,3%, proteína 76,9 ± 1,9 % (base seca), cenizas 13,5 ± 1,9 (base seca) y grasa no detectable.

Considerando que Aurretkoetxea y Perera (2001) obtuvieron un hidrolizado con humedad 34,8% y proteínas 31,3%; y que Calle y Gutiérrez (2019) lograron un hidrolizado con humedad 4,47%, proteína 79,22%, cenizas 4,10% y grasas 4,3%; es posible asociar estas incongruencias con la diferencia en la materia prima utilizada, en el presente trabajo se utilizaron residuos de piel de tiburón azul, mientras que Aurretkoetxea y Perera (2001) utilizaron residuos tñidos cocidos y Calle y Gutiérrez (2019) emplearon calamar gigante cocido. Además de que utilizaron diferentes enzimas, es de gran consideración el hecho de que sometieron los hidrolizados a secado, en el caso de Aurretkoetxea y Perera (2001) por estufa, y Calle y Gutiérrez (2019) por aspersion.

Por su parte, la composición química del hidrolizado obtenido con *Lactobacillus plantarum* en el presente trabajo fue: humedad 69,5 ± 2,6%, proteínas 19,5 ± 2,9%,

cenizas $10,5 \pm 0,1\%$ y grasas $0,10\%$. Teniendo en cuenta que la composición obtenida por Bello (1994) es humedad 65% , proteínas 16% , cenizas 7% y grasas 2% ; y que la composición obtenida por Areche et al. (1989) es humedad $62,33\%$, proteínas $18,74\%$, cenizas $5,17\%$ y grasas $11,4\%$; es posible inferir que, pese a que se utilizó diferente materia prima, se obtuvo un hidrolizado de características similares a las obtenidas por los autores antes mencionados.

Teniendo en cuenta que la composición química inicial de la piel de tiburón azul fue: humedad $30 \pm 0,6\%$, proteínas $27,08 \pm 0,3\%$, cenizas $5,2 \pm 0,3\%$ y grasas $< 0,10\%$; es posible determinar que el método microbiano obtuvo un rendimiento proteico de 72% , mientras que el método con enzima comercial recuperó un $38,77\%$ de proteínas. Considerando de Rodríguez-Díaz et al. (2011) obtuvieron un hidrolizado enzimático con un $89,3 \pm 1\%$ de rendimiento proteico, es posible que este parámetro sea dependiente del agente utilizado.

Con respecto a las encuestas, en donde 4 de los 5 encuestados prefirieron el método enzimático sobre el microbiano, los mismos expresaron que su preferencia por el método enzimático se basa en el menor tiempo de hidrólisis de la materia prima, lo que facilita su implementación y reduce la necesidad de contar con una gran infraestructura. A su vez, si bien solo 1 de los encuestados cuenta con los equipos necesarios para la producción de hidrolizados, los 4 restantes expresaron estar dispuesto a adquirirlos según la relación costo/beneficio que dicha producción genere. En ese sentido, los 5 manifestaron que justifica la inversión en recursos para implementar el sistema de hidrólisis si el costo es menor al de la disposición de residuos que manejan actualmente.

Pese a que los costos de producción de un hidrolizado enzimático superan sustancialmente los de disposición para compostaje ($719,8$ USD / tonelada vs. 22 USD / tonelada, respectivamente), es recomendable analizar las posibles aplicaciones del hidrolizado resultante con el fin de obtener una remuneración y solventar los gastos de producción, es decir, transformar los residuos de tiburón azul en un subproducto de la industria.

10. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio confirman la posibilidad de obtener hidrolizados de piel de tiburón azul (*Prionace glauca*) por acción de inóculos de *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™* (CL3052) y de enzima comercial FPH (Novozymes).

Se determinó como agente más eficiente enzima comercial FPH (Novozymes) adicionada al 0,5%, logrando la completa hidrólisis en 24 horas a 55°C. Dato que va acorde con la opinión de expertos del sector, respecto a que el método enzimático sería el más viable para su implementación en la industria pesquera.

En cuanto a *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™* (CL3052), se estableció que trabaja eficientemente a una concentración entre 10% y 15%, a 36°C, logrando un hidrolizado estable en 7 días.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Areche, N., Berenz, Z., y León, G. (1989). Desarrollo de ensilado de residuo de pescado utilizando bacterias lácticas del yogur. En FAO, *Segunda Consulta de Expertos sobre Tecnología de Productos Pesqueros en América Latina* (pp. 51-63). Roma: FAO.
- Aurretkoetxea, G. y Perera, M.N. (2001). Aprovechamiento de recursos pesqueros infrautilizados para la obtención de alimentos mejorados de peces de acuicultura. *Revista AquaTIC*, 13. Recuperado de <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/111/100>
- Bello, R. (1994). Experiencias con ensilado de pescado en Venezuela. En FAO, *Tratamiento y utilización de residuos de origen animal, pesquero y alimenticio en la alimentación animal* (pp. 1-14). La Habana: FAO.
- Benítez, A., Dragonetti, J.P., Friss de Kereki, C., Ayçaguer, C., y Varela, E. (2009). Rendimiento del Tiburón Azul (*Prionace glauca*) al desollado (pp. 28-29). En *Jornada Técnica de la Facultad de Veterinaria* (Vol. 6). Montevideo: Facultad de Veterinaria.
- Benítez, R., Ibarz, A. y Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227-236. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=535/53542208>
- Berenz, Z. (1994). Utilización del ensilado de residuos de pescado en pollos. En FAO, *Tratamiento y utilización de residuos de origen animal, pesquero y alimenticio en la alimentación animal* (pp. 15-28). La Habana: FAO.
- Berenz, Z. (1999). Procesamiento de ensilado de pescado. *XV Curso Internacional Tecnología de Procesamiento de Productos Pesqueros*. 80 p. Lima: Instituto Tecnológico Pesquero del Perú ITP – JICA.
- Bertullo, V. (1975). *Tecnología de los Productos y Subproductos de Pescados, Moluscos y Crustáceos*. Montevideo: Hemisferio Sur.
- Bertullo, E. (1989). Ensilado de pescado en la pesquería artesanal. En: FAO, *Segunda Consulta de Expertos sobre Tecnología de Productos Pesqueros en América Latina* (pp. 18-42). Roma: FAO.
- Blanco, M., Vázquez, J.A., Pérez-Martín, R. y Sotelo, C. (2017). *Hydrolysates of Fish Skin Collagen: An Opportunity for Valorizing Fish Industry Byproducts*. *Marine Drugs*, 15, 131. [doi:10.3390/md15050131](https://doi.org/10.3390/md15050131)
- Calle, J. y Gutiérrez, L. (2019). *Obtención de hidrolizado proteico de pota *Dosidicus gigas* por el método enzimático* (Tesis de grado). Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos, Universidad Nacional de Callao, Bellavista.
- Castillo, W.E, Sánchez, H.A. y Ochoa, G.M. (2019). Evaluación del ensilado de residuos de pescado y de cabeza de langostino fermentado con *Lactobacillus fermentus* aislado de cerdo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30 (4), 1456-1469. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i4.17165>
- Cardeñosa, D., Fields A.T., Babcock, E.A., Shea, K.H.S., Feldheim, K.A., y Chapman, D.D. (2020). Species composition of the largest shark fin retail-market un mainland China. *SCI Scientific Reports*, 10, 12914.
- Clarke, M.R., Clarke, D.C., Martins, H.R., y da Silva, H.M. (1996). The diet of the blue shark (*Prionace glauca*) in Azorean Waters. *Arquipélago Life and Marine Sciences*, 14A: 41-56.
- Compagno, L.J.V. (1984). *Sharks of the world: An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date*. Roma: FAO.

- Compagno, L. J. V. (2008). Pelagic elasmobranch diversity. En M.D. Camhi, E.K. Pikitch y E.A. Babcock, *Sharks of the Open Ocean: biology, fisheries, and conservation* (pp. 14-23). Oxford: Blackwell.
- Copes, J., Pellicer, K., del Hoyo G., y García Romero, N. (2006). Producción de ensilado de pescado en baja escala para uso de emprendimientos artesanales. *Analecta Veterinaria*, 26 (1), 5-8.
- De Man, J.M., Finley, J., Hurst, W.J., y Lee, C. (2018). *Principles of Food Chemistry* (4ª ed.). Gewerbestrasse: Springer.
- DINARA. (2016). Boletín informativo DINARA N°13. Recuperado de http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/boletin_informativo_no_13.pdf
- DINARA. (2017). Boletín informativo DINARA N°18. Recuperado de http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/boletin_informativo_dinara_no_18-noviembre_2017.pdf
- DINARA. (2018). Boletín informativo DINARA N°22. Recuperado de https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderiaagriculturapesca/files/documentos/publicaciones/boletin_informativo_de_dinara_no_22-noviembre_2018.pdf
http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/boletin_informativo_dinara_no_18-noviembre_2017.pdf
- DINARA. (2019). Boletín informativo DINARA N°26. Recuperado de http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/boletin_informativo_de_dinara_no_26-setiembre_2019.pdf
- DINARA. (2019). Boletín informativo DINARA N°27. Recuperado de http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/boletin_informativo_de_dinara_no_27-noviembre_2019.pdf
- Domingo, A., Forselledo, R., Miller, P., y Passadore, C. (2008). *Plan de acción nacional para la conservación de los condrictios en las pesquerías uruguayas*. Montevideo: DINARA.
- Dragonetti, J.P., Friss de Kereki, C., Fernández, S., Varela, E. y Costa, M. (2007). Ensilado biológico de residuos de caracol marino. En *Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria* (Vol. 5, pp. 21-23). Montevideo: FV.
- Durga, F., Poojaben, T., Raj, M., y Yagnesh, M. (2020) Properties and utilization of shark skin. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(1), 623-625.
- FAO. (1989). Desarrollo del Ensilado de pescado en América Latina. En FAO, *Segunda Consulta de Expertos sobre Tecnología de Productos Pesqueros en América Latina* (pp. 18-88). Roma: FAO.
- FAO. (1994). *Examen de la situación mundial de las especies altamente migratorias y las poblaciones transzonales*. Roma: FAO. Recuperado de <http://www.fao.org/3/t3740s/T3740S00.htm#TOC>
- FAO. (2018). Species Facts Sheets *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758). Roma: FAO. Recuperado de <http://www.fao.org/fishery/species/2018/en>
- Goldhor, S. y Regenstein, J. (2007). Waste management and co-product recovery in fish processing. En K. Waldron, *Handbook of waste management and co-product recovery in food processing* (pp. 388-416). Cornwall: CRC.
- Grogan, E. D. y Lund, R. (2004). The origin and relationships of early Chondrichthyes. En J.C. Carrier, J.A. Musik y M.R. Heithaus, *Biology of Sharks and Their Relatives* (pp. 3-31). Florida: CRC.
- Hofvendahl, K. y Hahn-Hagerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*,

- 26, 87-107.
- ITIS. Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS). Recuperado de https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSNysearch_v_alue=160424#null
- Kim, S-K. (2014). *Seafood Processing By-Products, trends, and applications*. New York: Springer.
- Kohler, N. E. y Turner, P. A. (2008). Stock structure of the blue shark (*Prionace glauca*) in the North Atlantic Ocean based on tagging data. En M.D. Camhi, E.K. Pikitch y E.A. Babcock, *Sharks of the Open Ocean: biology, fisheries, and conservation* (pp. 339-350). Oxford: Blackwell.
- Kuley, E., Ozyurt, G., Ozogul, I., Boga, M., Akyos, I., Rocha J.M., y Ozogul, F. (2019). The Role of Selected Lactic Acid Bacteria on organic Acid Accumulation during wet and spray-dried Fish-Based Silages. Contribution on the winning combination of microbial food safety and environmental sustainability. *Microorganisms*, 8.
- Nakano, H. y Stevens, J.D. (2008). The biology and ecology of the blue shark (*Prionace glauca*). En M.D. Camhi, E.K. Pikitch y E.A. Babcock, *Sharks of the Open Ocean: biology, fisheries, and conservation* (pp140-151). Oxford: Blackwell.
- Nion, H. (1999). *La pesquería de tiburones en Uruguay con especial referencia al cazón (Galeorhinus galeus, Linnaeus 1758)*. En FAO, *Case studies of the management of elasmobranch fisheries*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/x2097e/X2097E10.htm>
- Pough, F.H., Heiser, J.B. y Janis, C.M. (1996). *Vertebrate life* (4ª ed.). New Jersey: Prentice Halls.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. y Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Sep, pp 597- 635.
- Rodríguez-Díaz, J.C., Kurozawa, L.E., Netto, F.N y Hubinger, M.D. (2011). Optimization of the Enzymatic Hydrolysis of Blue Shark Skin. *Journal of Food Science*. 76(7), C938-49.
- Rodríguez-Díaz, J.C., Tonon, R. y Hubinger, M. (2014). Spray Drying of Blue Shark Skin Protein Hydrolysate: Physical, Morphological, and Antioxidant Properties. *Drying Technology*, 32(16), 1986-1996. [doi: 10.1080/07373937.2014.928726](https://doi.org/10.1080/07373937.2014.928726)
- Schleger, H.G. y Zaborosch, C. (1997). *Microbiología General*. Barcelona: Ediciones Omega.
- Shan, H., Franco, C., y Zhang, W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, 50 (1), 289-297. [doi: 10.1016/j.foodres.2012.10.031](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.031)
- Singh nee Nigam, P. y Pandey, A. (2009). *Biotechnology for Agro-industrial Residues Utilisation. Utilisation of Agro-Residues*. Berlin: Springer.
- Snelson Jr., F. F., Roman, B. L. y Burgess, G. H. (2008). The reproductive biology of pelagic elasmobranchs. En M.D. Camhi, E.K. Pikitch y E.A. Babcock, *Sharks of the Open Ocean: biology, fisheries, and conservation* (pp. 24-59). Oxford: Blackwell.
- Sousa, S., Vázquez, J., Pérez-Martín, R., Carvalho, A., y Gomes, A. (2017). Valorization of By-Products from Commercial Fish Species: Extraction and Chemical Properties of Skin Gelatins. *Molecules*, 22(9), 1545. [doi:10.3390/molecules22091545](https://doi.org/10.3390/molecules22091545)
- Wiki, G., Panné Huidobro, S.E., y Manca, E. (2006). *Manual para el proceso de*

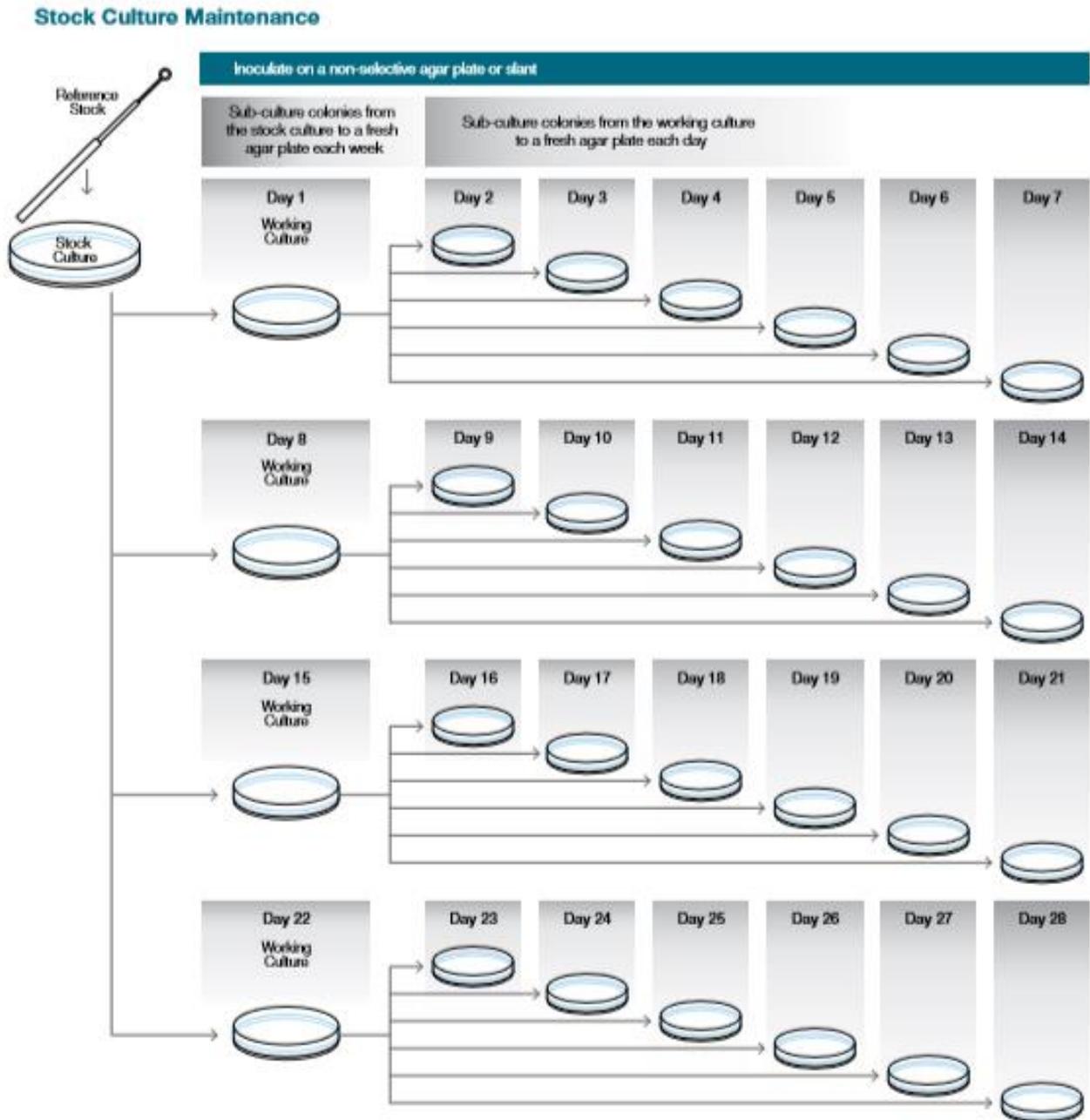
productos de la acuicultura. Buenos Aires: Dirección de Acuicultura de la Nación.

Worm, B., Lotze, H. K. y Myers, R. A. (2003). Predator diversity hotspots in the blue ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 9884–9888.

12. ANEXOS

ANEXO I

PROTOCOLO “Stock Culture Maintenance” ATCC®



ANEXO II

INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Fecha:

Responsable/s:

	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra	Muestra
pH/°Brix/método						
Olor						
Observaciones						

Comentarios

ANEXO III

ENCUESTA DE VIABILIDAD INDUSTRIAL

El objetivo del trabajo fue desarrollar hidrolizados de piel de tiburón azul (*Prionace glauca*) empleando dos formas de degradación biológica: *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014™* (CL3052) y una enzima comercial: FPH Novozymes. Se utilizó materia prima proveniente de dos plantas procesadoras uruguayas, agua destilada, melaza e inóculos de *Lactobacillus plantarum* y de la enzima comercial para realizar los ensayos en el laboratorio de la unidad académica de ciencia y tecnología de los productos pesqueros, ex Instituto de Investigaciones Pesqueras “Prof. Dr. Víctor H. Bertullo”.

Se midieron diariamente los valores de pH y °Brix (en el caso de la enzima), y se realizó una minuciosa inspección visual de los hidrolizados.

De los resultados obtenidos experimentalmente se desprende el siguiente resumen:

Ensayo experimental		
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Enzima comercial
Piel tiburón azul	0,500 kg	0,500 kg
Agua	100 ml	500 ml
Inóculo	50 ml	5 ml
Melaza	98 gr	-
Estufa inicial	36°C / 48 horas	85° C / 10 min
Temperatura	36°C	55°C
Tiempo hidrólisis	7 días	1 día

Tener en cuenta que para realizar el hidrolizado por ambos métodos es necesario contar con estufa, y para emplear *Lactobacillus plantarum* lo recomendable es capacitar al personal idóneo para que pueda reconstituir e inocular las cepas.

1. ¿Qué tan viable considera estos métodos?
2. A su parecer, ¿Cuál de los dos métodos sería más aplicable en la industria?
3. ¿Actualmente cuentan con los equipos necesarios para llevar a cabo esta propuesta?
4. Si la respuesta anterior fue negativa, ¿Considera usted que vale la pena invertir recursos en implementar un sistema de hidrólisis de residuos?