

Un enfoque integrado para la valorización de los subproductos de la lubina: Obtención de compuestos con valor añadido y bacterias ácido-lácticas.

An integrated approach for the valorization of sea bass by-products: Obtaining high-added value compounds and lactic acid bacteria.

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

Estudiante: María García Sánchez

Tutor/a académico/a: Dra. Ana Tomás Vidal y Dr. Miguel Jover Cerdá

Tutor externo: Dr. Francisco José Barba Orellana

Máster Interuniversitario en Acuicultura



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



VNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a la Universidad Politécnica de Valencia y a la Universidad de Valencia, en especial a todo el equipo del Máster Interuniversitario en Acuicultura por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo y al equipo del Dr. Francisco Barba por acogerme en su laboratorio para llevar a cabo esta investigación.

Gracias a la Dra. Ana Tomás por facilitarme los resultados de su laboratorio para poder dar cohesión al trabajo, por sus correcciones y disposición continua. Al Dr. Francisco Barba por darme la oportunidad de unirme a su equipo de investigación en el Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina de la Universidad de Valencia, hacerme hueco y permitirme trabajar en compañía de un gran equipo en el que desarrollarme como científica y a Carlos y Fran por su paciencia. Al Dr. Miguel Jover por la coordinación del máster y atender todas las propuestas de este trabajo.

Por otra parte, dar las gracias a mis padres y mi gran familia, siempre estáis para darme fuerza. A mis piñas por ser siempre motivo de alegría, a Álvaro, por estar a pie del cañón, a mi grupo de biotecnología (Ana, MJ, Marcos, Paloma, Isaac y un largo etc.) habéis confiado en mí siempre. A mis amigos de Hakuna, me hacéis muy feliz.

ÍNDICE

Resumen (Abstract)

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA	1
1.2. SUBPRODUCTOS DE PESCADO Y SU VALORIZACIÓN	5
1.2.1. Aceite y harina de pescado a partir de subproductos.....	9
1.2.2. Utilización de subproductos para el consumo humano.....	12
1.2.3. Compost, ensilados y biogás a partir de subproductos.....	14
1.2.4. Compuestos bioactivos de los subproductos.....	14
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	36
3. MATERIAL Y MÉTODOS	37
3.1. MUESTRAS	37
3.2. MICROORGANISMOS	37
3.4. DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS	39
3.5. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS	39
3.6. DETERMINACIÓN ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	40
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1. MACRONUTRIENTES	41
4.1.1. Aminoácidos	42
4.1.2. Ácidos grasos	43
4.2. CRECIMIENTO DE BACTERIAS Y DETERMINACIÓN DE PH	45
4.3. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	46
5. CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción de harina y aceite de pescado y porcentaje de subproducto utilizado en 2016 según región.....	10
Tabla 2. Exportaciones extracomunitarias de subproductos para el consumo humano.	13
Tabla 3. Componentes bioactivos de los subproductos acuícolas.	15
Tabla 4. Contenido proteico según la parte del pescado analizada..	17
Tabla 5. Concentración de EPA y DHA en lípidos de diferentes subproductos de pescado.	21
Tabla 6. Bacterias ácido-lácticas aisladas de los subproductos de pescado y su actividad principal.....	28
Tabla 7. Composición nutricional de los restos de lubina en seco	41
Tabla 8. Contenido en aminoácidos (g) por cada 100 gramos de restos de lubina ecológica.....	42
Tabla 9. Contenido de ácido graso (g) por cada 100 gramos de restos de lubina	44
Tabla 10. Resultado conteo cepas E3, E4, E7 y C8 plaqueadas a tiempo 0 y 72 horas.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la producción acuática mundial en el periodo 1950-2017	1
Figura 2. Producción de la acuicultura en millones de toneladas (excluyendo plantas acuáticas) en el mundo en 2016	2
Figura 3. Las 10 especies más producidas en 2017 y biomasa producida de cada una.....	3
Figura 4. Priorización estándar de las opciones de valorización de subproductos alimentarios de acuerdo con la jerarquía de valorización de la Directiva marco sobre residuos del Parlamento Europeo (2008)	7
Figura 5. Subproductos y evolución de su utilización en Noruega.....	7
Figura 6. Fracciones del pescado consideradas subproductos del total de peso seco	8
Figura 7. Esquema simplificado de la producción de harinas y aceites de pescado.	11
Figura 8. Porcentaje de la utilización de (a) subproducto de acuicultura en la producción de harina de pescado; (b) subproducto de acuicultura y pesca en la producción de aceite de pescado ...	12
Figura 9. Nutrientes y compuestos bioactivos de interés según el subproducto de pescado donde se encuentran.....	16
Figura 10. Mecanismos inhibitorios del crecimiento de organismos de <i>Fungi</i> por acción de los metabolitos de la fermentación por bacterias ácido-lácticas.	27
Figura 11. Crisoles utilizados para la estimación de MS y cenizas.....	38
Figura 12. Extractor de solventes marca ANKOM.	38
Figura 13. Cromatógrafo LECO serie 628.	39
Figura 14. Descenso de pH caldo de cultivo por fermentación de bacterias ácido-lácticas	46
Figura 15. Halos inhibición inóculos bacterias ácido-lácticas en siembras de hongos de los géneros <i>Aspergillus</i> (A), <i>Fusarium</i> (F) y <i>Penicillium</i> (P).....	47

Resumen

En la actualidad, la industria piscícola está en auge debido a la demanda creciente en el sector de la alimentación acuícola. El procesado de los productos acuícolas genera una gran cantidad de subproductos, aproximadamente entre el 30-70% del peso inicial del pescado. El aprovechamiento de estos subproductos es crucial para acabar con el desperdicio alimentario, evitando así pérdidas económicas y minimizando la contaminación que supone el desecho de esta materia prima. La utilización de estos subproductos para fabricar harina o aceite de pescado, fertilizantes o alimentos procesados está presente en el mercado; sin embargo, se ha demostrado la presencia de muchos nutrientes y compuestos bioactivos en los subproductos que tienen un gran interés para las diferentes industrias (ej. alimentaria, cosmética, farmacéutica, etc.). En el presente estudio se han evaluado los subproductos de lubina (*Dicentrarchus labrax*) respecto a su composición en aminoácidos, ácidos grasos y la potencial actividad antifúngica contra *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*, de los componentes del caldo de fermentación de subproductos de lubina fermentados por bacterias ácido-lácticas aisladas de subproductos de la misma. Los resultados obtenidos mostraron un alto contenido en arginina (3,11 g/ 100 g muestra) así como la presencia de ácidos eicosapentanoico (EPA) (1,56 g/100 g muestra) y docosahexanoico (DHA) (3,51 g/100 g muestra). La actividad antifúngica de los compuestos del caldo de fermentación no pudo ser demostrada en el presente estudio por la ausencia de inhibición del crecimiento de los hongos cultivados. En posteriores trabajos sería necesario reformular el caldo de fermentación para optimizar el proceso de obtención de compuestos con carácter antifúngico. Estos componentes pueden tener un papel importante en la biopreservación de alimentos de manera natural, eliminando el uso de sustancias químicas.

Palabras clave: Bacterias ácido-lácticas; subproductos; ácidos grasos; aminoácidos; actividad antifúngica; fermentación; bioprotección.

Abstract:

Nowadays, aquaculture and fishing industry is growing quickly due to increasing demand in fish products. The processing of these products generates a large quantity of by-products, which can reach between 30 to 70% of the initial fish weight. The use of this by-products can be very beneficial as it would contribute to reduce fish waste, economic losses as well as pollution. The application of this by-products to make fishmeal or fish oil, fertilizers and processed products is presently in the market. However, many studies have shown the potential applications in industry of the nutrients and bioactive compounds of fish by-products (e. g. food, cosmetic, pharmaceutical, etc.). The present MSc thesis aims to show the potential of seabass (*Dicentrarchus labrax*) by-products. For that, a lab study of the composition of amino acids and fatty acids have been made. It is also have been studied the potential antifungal activity against *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium* of the components of the fermented broth of seabass by-products fermented by lactic acid bacteria isolated from seabass by-products. The results show a high proportion of arginine (3,11 g/ 100 g sample). It also shows an important content of eicosapentanoic acid (EPA) (1,56 g/100 g sample) and docosahexanoic acid (DHA) (3,51 g/100 g sample). The antifungal activity of the fermentation broth components could not be confirmed due to the lack of inhibition zone diameter. Next studies have to reformulate the fermentation broth in order to obtain antifungal compounds. The application of this antifungal compounds could improve and develop food natural biopreservation without the use of added chemicals.

Key words: lactic acid bacterias; by-products; amino acids; fatty acids; antifungal activity; fermentation; bioprotection.

1. Introducción

1.1. Situación actual de la acuicultura

La acuicultura es la actividad dedicada a la producción de especies acuáticas animales y vegetales. Su rápido desarrollo y crecimiento en el mercado permiten que se le haya denominado “Revolución azul” (FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2019). En la actualidad, la acuicultura es una de las principales fuentes de proteínas a nivel global, junto con la pesca y ganadería. Tal y como se muestra en la **Figura 1** la producción obtenida mediante la acuicultura es ligeramente superior a la pesca, situándose la producción acuática total entorno a los 200 millones de toneladas en 2017, de acuerdo con el informe establecido por la FAO en el año 2019.

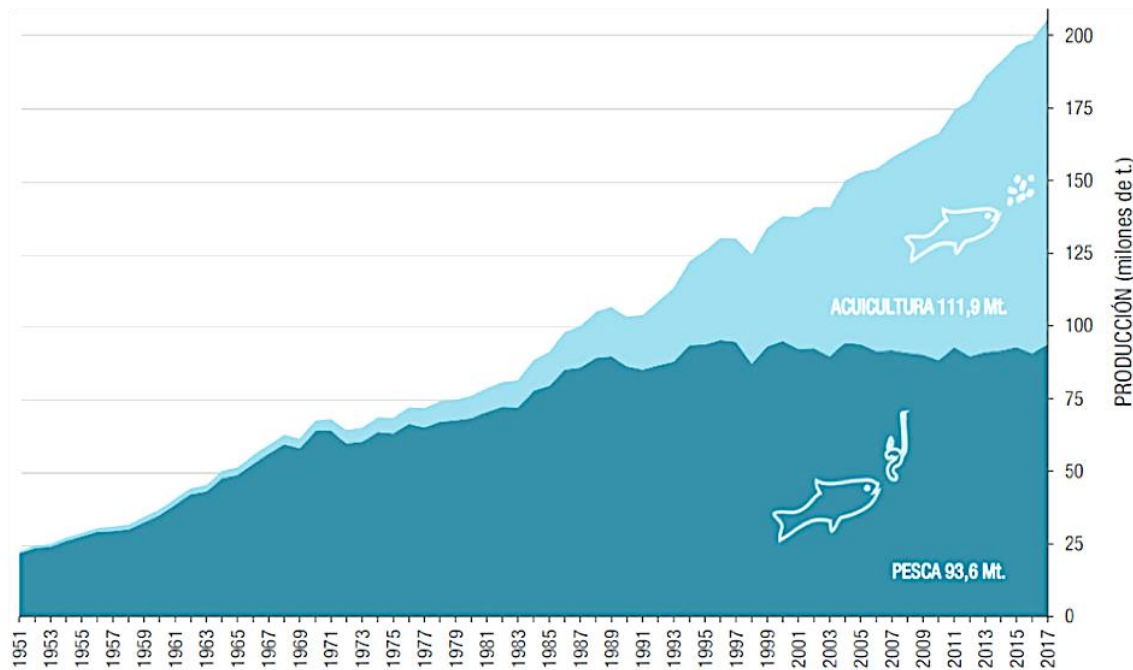


Figura 1. Evolución de la producción acuática mundial en el periodo 1950-2017. Fuente: FAO, (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) (2019).

Esta actividad milenaria tiene su máxima producción en Asia, concretamente en China, Indonesia y la India (**Figura 2**), y hasta las últimas décadas no se consideraba como una fuente de obtención de productos acuáticos comparable a la pesca. Sin embargo, el crecimiento de la acuicultura ha llevado a otros países de Europa y América a apostar por esta actividad cuyo rendimiento solo ha ido en aumento a lo largo de los años (Garlock y col., 2020). El desarrollo de la economía azul depende del crecimiento en la producción de la acuicultura marina y continental. Además, esta actividad se ha visto reforzada

fundamentalmente por el aumento en el consumo de pescado por parte de la población, siendo éste de 9 kilogramos *per cápita* en 1961 y aumentando hasta 20 kilogramos *per cápita* en 2016, lo que ha supuesto un aumento en la producción de pescado de 37 millones de toneladas a 200 en estos 55 años (Ahmed y col., 2019 y Nawaz y col., 2020).

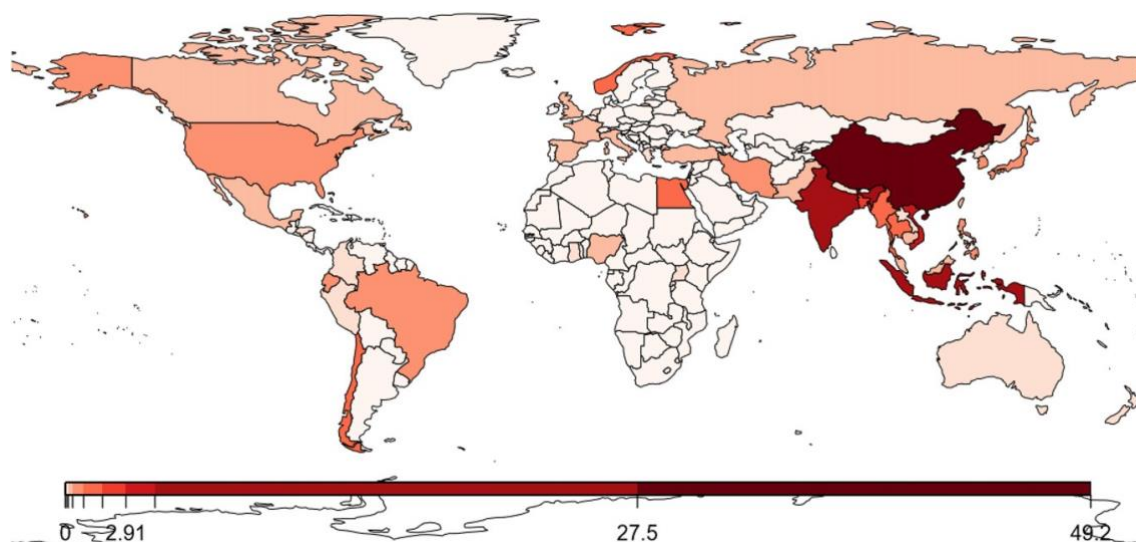


Figura 2. Producción de la acuicultura en millones de toneladas (excluyendo plantas acuáticas) en el mundo en 2016. Fuente: Garlock y col., 2020.

Las especies animales producidas en acuicultura de acuerdo con el millón de toneladas producidas, está encabezado por el ostión japonés, con una producción anual de 5,5 millones de toneladas en 2017, seguida por la carpa china (5,4 millones de toneladas) y la carpa plateada (4,7 millones de toneladas). Las diez especies animales más producidas en acuicultura suponen un 50,8% de la producción total a nivel mundial. Tal y como se observa en la **Figura 3**, las dos especies más producidas en 2017 a nivel mundial fueron especies vegetales (*Laminaria japonesa* y *Alga Eucheuma*) observando un descenso en la producción anual de *Alga Eucheuma* del 11,6% (APROMAR, 2019).

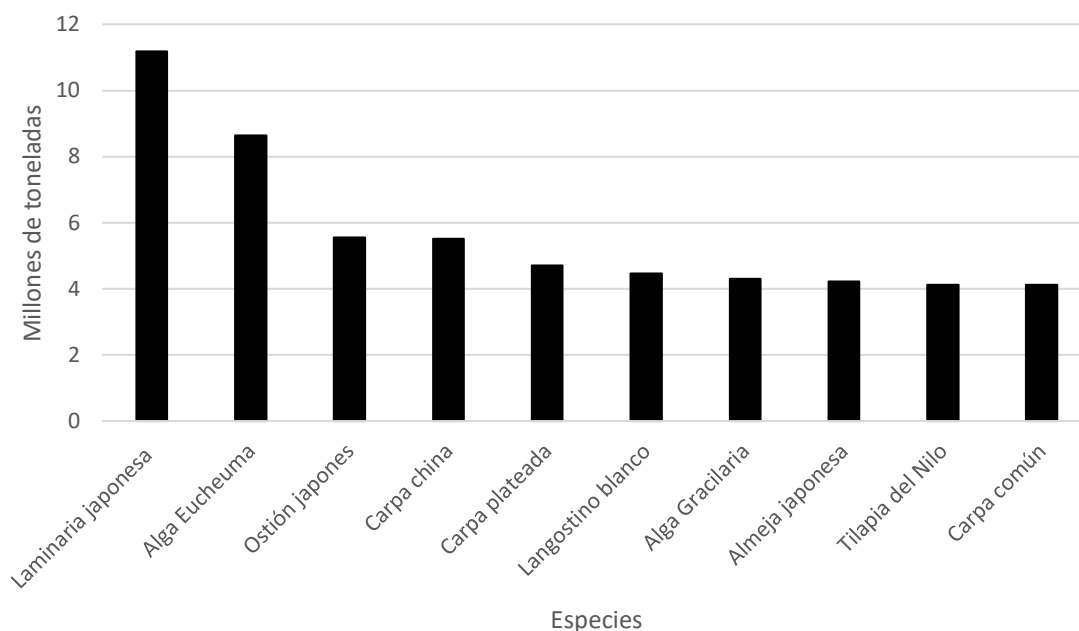


Figura 3. Las 10 especies más producidas en 2017 y biomasa producida de cada una.
Fuente: APROMAR, 2019.

En cuanto a las especies más producidas en la Unión Europea en 2017, están encabezadas por el mejillón (49.3844 toneladas), seguido del salmón del Atlántico (209.180 t), trucha arco iris (185.316 t), la dorada (95.390 t) y la lubina (79.350 t). Las condiciones y el tamaño de la costa europea son propicios para la acuicultura, además, la regulación correspondiente al producto otorga a las especies de un valor añadido en el que se asegura la seguridad de los trabajadores, el cuidado del entorno natural y el cumplimiento de los parámetros de cuidado del animal. En España, el mejillón fue en 2018, de acuerdo con el peso producido, la principal especie producida con 273.600 toneladas, tras esta, la lubina, la trucha arco iris y la dorada (con 22.460, 18.856, 14.930 toneladas, respectivamente) (APROMAR, 2019).

Los países en vías de desarrollo todavía no tienen una infraestructura en el sector de la acuicultura capaz de sostener la alimentación de sus habitantes, pese a ser países con una gran cantidad de aguas marinas y continentales. Además, en muchas ocasiones no se proporcionan datos a la FAO para realizar las estadísticas anuales de la producción en acuicultura, por lo que, o bien quedan excluidas o su producción es estimada en función de los datos disponibles, los cuales son escasos (Zhou, 2018 y Garlock y col., 2020).

La acuicultura es una fuente de proteína animal con un impacto medioambiental menor al que presenta la ganadería y que combate la reducción de biomasa acuática disponible a nivel mundial. El aumento de la producción de esta actividad permite que el suministro de producto acuícola suponga una fuente de alimento en auge a nivel global (Garlock y col., 2020). “Transición azul” es el concepto elegido para definir el paso de la pesca a la acuicultura y está siendo incluido en programas de desarrollo de la FAO, del banco mundial y de compañías privadas. Este cambio pretende reducir el daño sufrido en los fondos marinos y recuperar la fauna silvestre que se ha visto reducida ante la pesca. Además, como actividad económica, permite a los países generar una fuente de ingresos y de empleo. Se trata pues de una transición que podría definirse tanto social como ecológica debido a las causas que la promueven y a la conexión entre ambas (FAO, 2019). Esta transición no pretende eliminar la pesca sino minimizar los daños causados por esta actividad mediante la implementación de la acuicultura para dar con un equilibrio entre ambas en el que el medio ambiente y las actividades socioeconómicas no se vean gravemente afectadas (Nahuelhual y col., 2018).

Pese a ser una actividad considerada como alternativa a la pesca con un impacto ambiental reducido, la acuicultura aún es dependiente de la pesca para la alimentación de especies carnívoras. La producción marina modifica el hábitat en el que se establece provocando una variación en la biodiversidad y en las condiciones del ecosistema, además del impacto socioeconómico directo que tiene sobre las poblaciones pesqueras. El aprovechamiento total de los pescados, incluyendo los subproductos de la línea de producción, es importante para asegurar reducir el impacto y mejorar las consecuencias negativas que puede tener esta actividad sobre el medio y la economía (Naylor y col., 2000). En el mercado actual existe un reclamo real del consumidor que demanda productos con el menor impacto ambiental posible, así como un compromiso ético y social de las empresas involucradas en el proceso de producción. El aprovechamiento de subproductos de pescado tanto en acuicultura como en otras áreas del mercado puede suponer una mejora considerable de la imagen de la acuicultura en la actualidad (Banovic y col., 2019).

1.2. Subproductos de pescado y su valorización

El procesamiento de los productos acuícolas junto con el carácter perecedero de estos genera diariamente una gran cantidad de subproductos sólidos y líquidos. El aprovechamiento de la biomasa total producida es tan solo del 50-60%, y dentro de la acuicultura la producción de descartes se encuentra entre el 20-60% de la materia prima. Uno de los principales objetivos de las políticas europeas es promover la sostenibilidad ambiental, económica y social; es por ello por lo que la revalorización de los descartes en la cadena de producción es un paso crucial para el cumplimiento de los objetivos de sostenibilidad y la rentabilidad del sector (Shahidi, 2006, Rustad, 2007, Olsen y col., 2014 y López-Pedrouso y col., 2020). Anualmente, se estima una producción de 60 millones toneladas de subproductos por parte de la acuicultura y la pesca; de las cuales, 20 millones de toneladas son por parte de la acuicultura (Stevens y col., 2018 y Nawaz y col., 2020). La correcta gestión de los descartes mitigaría las consecuencias negativas de esta gran cantidad de subproductos. Las distintas biomoléculas presentes en los subproductos de pescado presentan una gran variedad de aplicaciones para el aprovechamiento de estos en la industria de la alimentación (López-Pedrouso y col., 2020).

Al tratarse de una actividad comercial, el producto no considerado apto para la venta ya sea por tamaño, apariencia externa o contenido, es en muchas ocasiones separado del producto en venta. En muchos países el pescado no se vende fresco sino procesado, por lo que la parte del producto que no es aprovechada para su comercio es descartada en la cadena de producción (piel, vísceras, columna, cabeza, etc.). El porcentaje de procesado a partir de la producción es del 5, 40 y 90% para peces, moluscos y crustáceos, respectivamente. El procesado habitual de los peces es el fileteado, mientras que la cocción supone el tratamiento habitual en el caso de los moluscos, y el desconchado, así como el desmigado constituyen el proceso más comúnmente utilizado en los crustáceos (Iñarra y col., 2018).

También es importante resaltar que los subproductos producidos a partir de la acuicultura varían en función de las empresas que los procesan. De hecho, el

fileteado, salado y ahumado generan un residuo sólido con un porcentaje de subproducto generado estimado entre el 50-75% del peso total del pescado, mientras que el enlatado produce alrededor del 30-65% de residuo sólido con respecto del total. Asimismo, cabe destacar que el procesado de los crustáceos y moluscos genera entorno al 20-50% de residuos sólidos, pese a que el 45% del marisco proviene del desecho de exoesqueleto y cefalotórax (Ferraro y col., 2010 y Sila y col., 2015). En otros casos, el residuo proviene de mortandades no deseadas o incluso recortes propios de la producción (OESA, 2017).

El destino del subproducto varía también de acuerdo a la especie y países productores. Por ejemplo, el caso de la piel de tilapia, la cual se utiliza como material de complementos y ropa en Brasil, como comida en forma de frito en Asia y, por último, está presente en un tercer mercado como fuente de colágeno gracias a que el ambiente en el que se cría permite que soporte altas temperaturas necesarias para su tratamiento. También se utiliza la cabeza y los cortes de tilapia para usarlos en caldos o como guarnición, respectivamente (Ramírez, 2013).

La gestión de subproductos de acuerdo con la jerarquía de valorización de la Directiva marco sobre residuos del Parlamento Europeo (2008) establece como primera opción la prevención y reducción de la producción de subproductos; seguido de un mantenimiento del subproducto en la cadena alimentaria mediante su comercialización, producción de ingredientes alimentarios o la obtención de biomoléculas de alto valor que serán utilizadas en la industria. El tercer lugar lo ocupa la nutrición animal, en la producción de aceite y harina de pescado. En último lugar, se encuentra la producción de energía, compostaje o incineración. La utilización de vertederos para deshacerse del subproducto no forma parte de una de las opciones de valorización y se tomará como última opción. En la actualidad, la nutrición animal es la más común, sobre todo cuando la cercanía o facilidad de comunicación con una instalación facilitan este proceso (Iñarra y col., 2018).

En estos momentos, atendiendo a la categoría del producto al que se destina el subproducto, podemos distinguir entre cinco clases: i) alimentación humana, ii)

bioproductos, iii) alimentación animal, iv) usos industriales, v) energía y usos agronómicos (Iñarra y col., 2018).

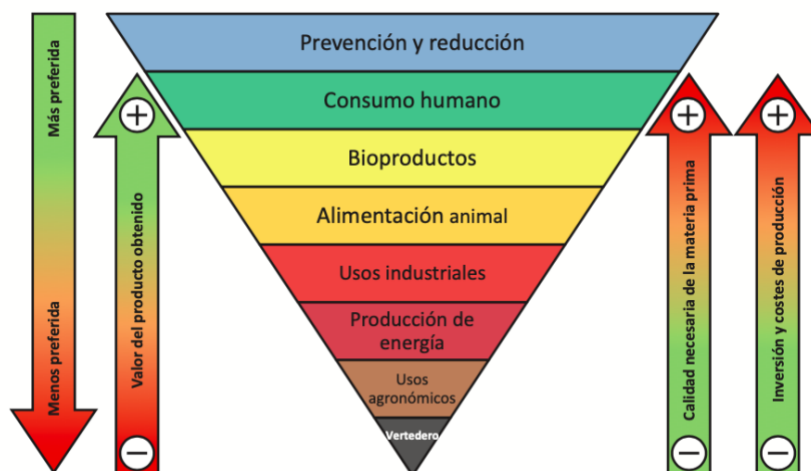


Figura 4. Priorización estándar de las opciones de valorización de subproductos alimentarios de acuerdo con la jerarquía de valorización de la Directiva marco sobre residuos del Parlamento Europeo (2008). Fuente: Iñarra y col., 2018.

La utilización de los subproductos de pescado como fuente de productos con distintas aplicaciones tiene un origen muy antiguo. Por ejemplo, ya en el año 1639, en Noruega, comenzó a crearse una ley que promovía su uso en otras actividades económicas. Actualmente, en Noruega se procesan aproximadamente 800.000 toneladas de subproductos anualmente (Figura 5). Asimismo, Vietnam, entre otros países, también están invirtiendo fuerzas en el aprovechamiento de los subproductos. En el caso de Portugal, el enlatado de sardina y caballa genera un total de 19.600 toneladas anuales de subproductos y el enlatado de atún generó 3.720 toneladas de subproductos en 2009 (Martí-Quijal, 2020).

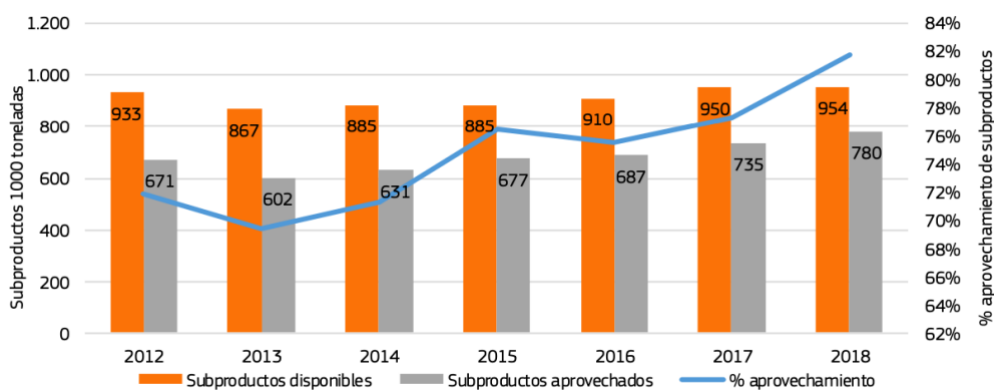


Figura 5. Subproductos y evolución de su utilización en Noruega. Volumen en 1.000 toneladas. Fuente: EUMOFA, 2020.

La reutilización de los subproductos de la industria acuícola es una realidad exclusiva de algunas naciones y no está vigente en muchas otras. Así por ejemplo, el aprovechamiento de los subproductos está siendo reevaluado en la industria por motivos económicos y medioambientales, y también por la importancia del aprovechamiento del alimento ante un aumento de la población estimado en 9.700 millones de personas en 2050 según la ONU. Distintos estudios muestran que la correcta utilización de estos subproductos tiene un gran potencial en la industria piscícola. Los subproductos típicos del pescado son: piel, cabeza, sangre, esqueleto, víscera, pared abdominal, exoesqueleto y recortes (Stevens y col., 2018).

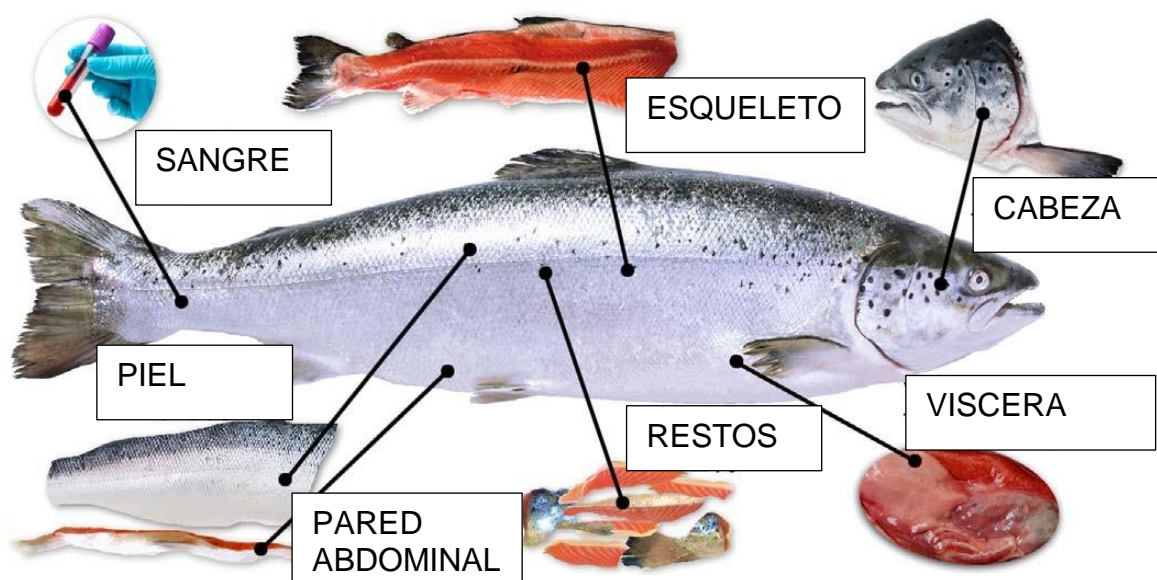


Figura 6. Fracciones del pescado consideradas subproductos del total de peso seco.
Modificada de: Stevens y col., 2018.

Cuando los subproductos generados en la acuicultura no entran en la cadena de alimentación humana por motivos higiénicos o sanitarios, se les denomina subproductos animales no destinados al consumo humano (SANDACH) y es el ejemplo de los aceites y harinas de pescado y del compost, biogás y ensilados (Ministerio de Medio Ambiente, 2012).

1.2.1. Aceite y harina de pescado a partir de subproductos.

Tradicionalmente el uso de subproductos ha estado limitado a alimentación de animales, fertilizantes o descartes. Los subproductos del procesado del pescado se dedican principalmente a la producción de aceite y harina de pescado. Esto se debe a que el metabolismo y la fisiología de los peces carnívoros requiere de una alimentación rica en n3 que se puede conseguir de manera fácil con los subproductos de la industria piscícola; y es este contenido en EPA y DHA lo que mantiene el pescado en el mercado, por lo que su mantenimiento es crucial para la economía azul. Pese a esta alternativa sostenible en la producción de harinas y aceite de pescado, 30 millones de toneladas de peces pelágicos capturados en la pesca fueron utilizados para la producción de harina y aceite de pescado, causando graves consecuencias medioambientales. La utilización de subproductos de pescado para la fabricación de la totalidad de harinas y aceites de pescado disminuiría el deterioro de los ecosistemas marinos (EUMOFA, *Observatorio Europeo del Mercado de los Productos de la Pesca y de la Acuicultura*, 2020)

En el caso de las piscifactorías marinas existen varios factores que dificultan la obtención de subproductos: i) la disponibilidad intermitente de estos dado la estacionalidad en la producción, ii) una gran producción de subproductos en un periodo corto de tiempo dado a la limitación de días de procesado y iii) la localización de las jaulas marinas a veces alejadas de los lugares de procesado (Bechtel, 2007). Un estudio reciente propone la utilización de los subproductos derivados de la acuicultura multitrófica integrada como ingredientes para piensos de pescado. El aumento de biomasa de poliquetos (*Sabella spallanzanii*) y macroalgas (*Chaetomorpha linum*) que forman parte del sistema multitrófico integrado como bioremediadores podría aprovecharse para la alimentación de los peces. Además, estas especies están enriquecidas, entre otras cosas, por el pienso no consumido por los mismos los peces, el cual tiene sustancias nutritivas que pueden ser aprovechadas dándoles una “segunda vida” (Stabili y col, 2019).

En 2012, el 74% del aceite de pescado producido, así como el 68% de la harina de pescado se utilizaron en acuicultura. De este modo, aunque se han estudiado

alternativas como insectos, fuentes vegetales y animales terrestres, no siempre se cubren las necesidades nutricionales de los peces carnívoros. En la producción de aceite y harina de pescado en 2016, se estima que, de los 20 millones de toneladas de materia prima aprovechada, 1,95 millones de toneladas proceden de subproductos de acuicultura, de las cuales, 330.000 toneladas provinieron de Europa; y otros 3,75 millones de toneladas procedieron de subproductos de la pesca extractiva. Los subproductos de pescado, tanto de pesca como acuicultura, representan entre el 25 y el 35% del volumen total del aceite y harina de pescado producidos. La industria europea de la harina de pescado obtiene el 54% de su materia prima a partir de subproductos, lo que la encabeza en el uso de subproductos en esta industria, seguida de Asia (exceptuando China) con un 44% y de China con un 35% (**Tabla 1**). Las plantas de harina de pescado de Francia Alemania y España dependen en su totalidad de los subproductos de pescado (FAO, 2018; Jacobsen y Marinho, 2018, EUMOFA, 2020 y Kok y col., 2020).

Tabla 1. Producción de harina y aceite de pescado y porcentaje de subproducto utilizado en 2016 según región. Fuente: EUMOFA, 2020.

	Producción de harina de pescado		Producción de aceite de pescado	
		% subproducto		% subproducto
EUROPA	701	54%	191	47%
ASIA (exc. CHINA)	1.034	44%	146	30%
CHINA	433	35%	64	25%
ORIENTE MEDIO	55	23%	10	24%
CIS	84	32%	20	20%
AFRICA	206	29%	37	24%
SUDAMERICA	1.821	16%	353	14%
NORTEAMERICA	288	41%	91	22%
OCEANÍA	16	85%	4	89%
Total	4.638	33%	916	26%

*Volumen en 1.000 toneladas.

La producción de alimentación para los peces (harina y aceite de pescado) necesitaba de 4 a 6 kilogramos de pescado para la producción de tan solo 1 kilogramo de alimento. Esta proporción era insostenible, por lo que muchos estudios investigaron la posibilidad de sustituir las proteínas animales de las harinas y aceites de pescado por proteínas vegetales. En la actualidad, la utilización de productos/subproductos de pescado puede ser reemplazada en un

75% por proteínas de origen vegetal sin causar efectos negativos en el crecimiento de los peces, pero si en los procesos metabólicos y en el potencial proteolítico del músculo del periodo *post mortem* temprano (Álvarez Trujillo, 2012 y Matos y col., 2014). En la fase de crecimiento de *Sparus aurata* se ha probado la eficacia de la sustitución del 100% de la harina de pescado por proteínas vegetales y aminoácidos esenciales sintéticos. El mismo estudio probó que tanto las doradas alimentadas con la dieta por harina de pescado como las de sustitución mostraron el mismo patrón de deterioro en el periodo *post mortem* (Zaragozá y col., 2020). El nivel de sustitución de la harina de pescado por un concentrado de proteínas de soja posible sin mostrar efectos negativos es del 82,5% en *Acanthopagrus schlegelii* (Kalhor y col., 2018). Los avances en la sustitución por proteínas vegetales permiten una sustitución efectiva con índices de crecimiento similares. Esta alternativa reduce el impacto causado en el medio por la pesca extractiva y permitirá dar otro tipo de salida a los subproductos de pescado empleados hasta la fecha en harinas y aceites de pescado (Caruso, 2015).

La harina de pescado y aceite de pescado obtenidas a partir de los subproductos de la acuicultura requieren de un refinamiento para mantener los parámetros de calidad requeridos y ser competitivas en el mercado, así como un control para que no se dé la transmisión de enfermedades entre especies (Ido y Kaneta, 2020). En la **Figura 7** se muestra el esquema simplificado de la producción de harinas y aceites de pescado a partir de subproductos:

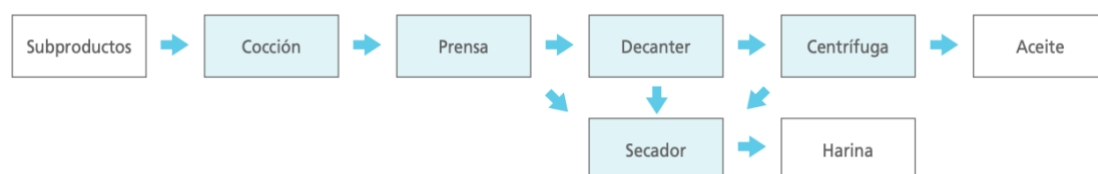
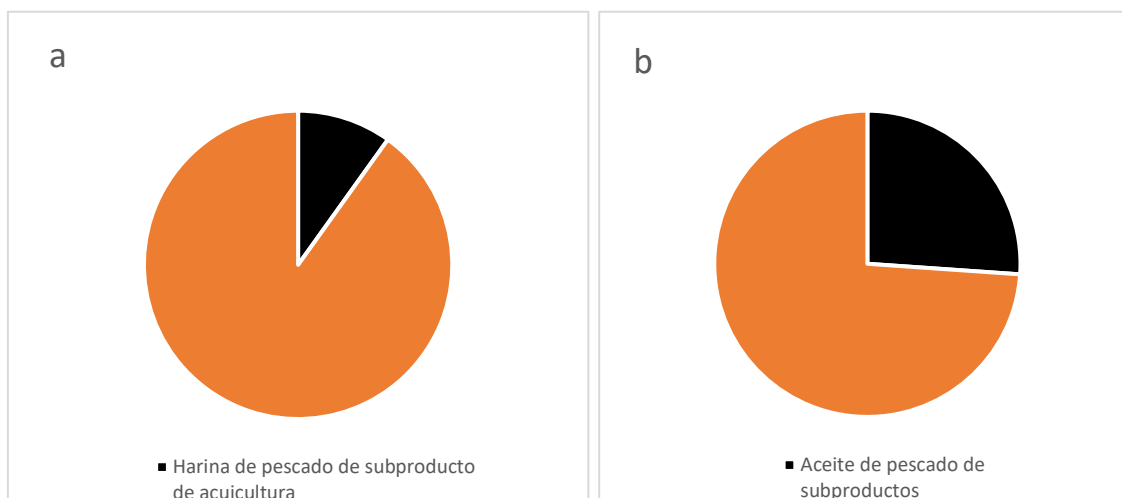


Figura 7. Esquema simplificado de la producción de harinas y aceites de pescado. Fuente: Iñarra y col., 2018.

En 2016, el 26% de la producción total de aceite de pescado procedía de subproductos de acuicultura y pesca y el 9,9% de la harina de pescado procedía de subproductos de la acuicultura (y el 33% de la pesca y acuicultura), tal y como se muestra en la **Figura 8** (Jackson & Newton, 2016). Las especies de mayor valor en el mercado, como el salmón y el langostino, son las que mayormente

requieren de la presencia de ingredientes marinos en sus dietas para poder ofrecer al consumidor un alto contenido en n3 (Kok y col., 2020).



La utilización de los subproductos en la producción de harina y aceite de pescado requiere de unos parámetros de calidad mínimos:

- Nitrógeno básico total volátil.
- Aminas biógenas: con un máximo de 1000 ppm para la histamina y 2000 ppm para el total de las aminas biógenas.
- Dioxinas: provienen de una fuente antropogénica y se acumulan en la cadena alimenticia. Se requiere de un proceso de extracción para su eliminación antes de su procesado final (Jacobsen y Marinho, 2018).

1.2.2. Utilización de subproductos para el consumo humano.

En 2018, 36.133 toneladas de subproductos exportados fueron destinadas a consumo humano, estas exportaciones al mercado asiático constituyeron un 70% de los volúmenes totales, con destinos principales a China, Japón y Vietnam; y 20.500 toneladas importadas de subproductos con el mismo fin. Los países de origen principales que importan subproductos de pescado a la Unión Europea son Estados Unidos, Noruega, China y Groenlandia, que constituyeron en conjunto el 79% del volumen total importados en 2018. Los subproductos importados principales son hígado, huevas y lechas de pescado (EUMOFA, 2020).

Tabla 2. Exportaciones extracomunitarias de subproductos para el consumo humano.
Fuente: EUMOFA, 2020.

Producto	Volumen 2016	Volumen 2017	Volumen 2018
Aletas de pescado, cabezas, colas, vejigas natatorias y otros despojos comestibles de pescado, congelados	0	7.113	24.184
Aletas de tiburón, congeladas	0	1.783	2.173
Otros hígados, huevas y lechas, congelados	3.222	3.644	4.732
Caviar	203	81	88
Sustitutos del caviar	1.152	1.201	1.346
Cabezas, colas y vejigas natatorias de pescado	1.252	1.291	639
Otros	2.840	2.922	2.975
Total	8.669	18.035	36.133

* Volumen en toneladas

Otros productos que se comercializan para el consumo humano son las nuevas fuentes de proteínas de origen marino que están representadas de manera principal por el surimi, que significa “carne de pescado machacada y molida”. El valor nutricional para su consumo humano se da gracias a su alto contenido en proteínas y la ausencia de colesterol. La principal producción de surimi se da a partir de especies marinas de bajo valor comercial, sin embargo, los subproductos de la industria procesadora de pescado se han orientado también hacia este producto reestructurado del pescado (Deán, 2016). La hidrólisis enzimática de los subproductos es el mecanismo de obtención de estos nuevos productos que consiste en tres etapas: pretratamiento para la obtención de una mezcla homogenizada agua-subproducto, la hidrólisis enzimática de la pasta a unas condiciones conocidas y posterior inactivación de la enzima, y, por último, centrifugación para la separación de la fase grasa de la proteica. Esta última se

seca para dar lugar al hidrolizado. Los valores obtenidos en este procesamiento de subproductos (con mejores resultados con cabeza, vísceras y cola) son similares a los obtenidos del procesado del músculo de los peces (Zapata y Castañeda, 2017).

1.2.3. Compost, ensilados y biogás a partir de subproductos

El compost se obtiene mediante la descomposición aerobia de la materia orgánica del subproducto y su aplicación se da en usos agrícolas y residenciales, con valor comercial y a nivel civil en términos municipales (cobertura de vertederos y carreteras, reforestación...). La aplicación principal del compost es como sustituto o suplemento de fertilizantes, su procesamiento requiere de la mezcla del subproducto con otros sustratos como serrín, astillas, ramas, estiércol, etc. El ensilado se obtiene por la autólisis del pescado o subproductos de este agregando ácidos, enzimas o bacterias ácido-lácticas, dando lugar a un producto líquido que se reutiliza en la acuicultura para el crecimiento de especies distintas a la especie de origen y también en alimentación en ganadería. Por último, el biogás se produce a partir de la digestión anaerobia de la materia orgánica de los subproductos mediante diversos microorganismos. Este gas es utilizado para la producción de energía térmica o eléctrica, sin embargo, la obtención de un gas apto para su uso requiere de la mezcla de la materia orgánica con otro tipo de sustrato (Iñarra y col., 2018).

1.2.4. Compuestos bioactivos de los subproductos

El valor otorgado a los subproductos se debe en ocasiones a su conformación de compuestos bioactivos como proteínas, enzimas, ácidos grasos y biopolímeros con muchas aplicaciones en el mercado. Además, los subproductos de pescado pueden ser utilizados para la fabricación de harinas o aceites de pescado, producción de alimentos como el surimi o la creación de productos de valor añadido como los de las industrias farmacéutica, nutracéutica y química (Shahidi, 2006, Olsen y col., 2014 y Vázquez y col., 2019).

Tabla 3. Componentes bioactivos de los subproductos acuícolas. Modificado de: Shahidi, 2006, Olsen y col., 2014, Perera y Rajapakse, 2016 y Stevens y col., 2018.

Subproducto	Componente con valor	Área de aplicación
Cabeza, huesos, aletas, vísceras, sangre, recortes, piel y exoesqueleto	Proteínas/Biopéptidos	Nutracéutica, potenciador inmunitario
Cabeza, esqueleto, aletas y piel	• Colágeno/Gelatina	Medicina regenerativa
Cabeza, esqueleto, aletas y piel	Minerales/Calcio	Alimentación, nutracéutica
Esqueleto	• Hidroxiapatito	Biomedicina
Exoesqueleto	Quitosano, Glucosamina	Nutracéutica, agricultura, alimentación, purificación de agua
Exoesqueleto	Quitina	Inmunomodulador
Cabeza, exoesqueleto, pared abdominal y vísceras	Ácidos grasos n3	Nutracéutica, suplementos alimenticios, alimentación
Cabeza, huesos, aletas, vísceras, sangres, recortes y piel.	Lípidos	Producción bioetanol
Conchas, gónadas de algunas especies	Carotenoides/xantófilas	Nutracéutica, pienso para peces
	Sulfato amónico	Suplementos, alivio para artrosis
	Escualeno	Cuidado de la piel
Vísceras	Bacterias acidolácticas	Bioprotección alimentaria
Aceite de hígado de bacalao	Micronutrientes/Vitaminas	Nutracéutica
	Productos químicos refinados	Otros

Las aplicaciones de estos subproductos pueden dedicarse a la misma industria piscícola, para alimentación humana o de los mismos peces, pero también para la obtención de productos secundarios para otras industrias (Irianto y col., 2014). Sin embargo, las distintas aplicaciones propuestas todavía necesitan de investigación que optimice su producción a nivel industrial para dar lugar a

productos de valor elevado y viables en el mercado. Por ahora, las aplicaciones de subproductos se centran en alimentación tanto como alimento como ingredientes de estos (Olsen y col., 2014). Los subproductos pueden clasificarse en directos, siendo aquellos que se utilizan de manera directa para alimentación humana o indirectos, utilizados como fertilizantes o alimentación animal (Gamarro y col., 2013). Los diferentes compuestos bioactivos obtenidos de los subproductos de pescado varían de acuerdo con la parte del cuerpo del pescado de la cual son aislados (**Figura 9**). En la actualidad ha generado un gran interés el uso de bacterias ácido-lácticas, cuyo producto de fermentación permite la recuperación de parte de estas biomoléculas sin generar residuos contaminantes (Rai y col., 2011).

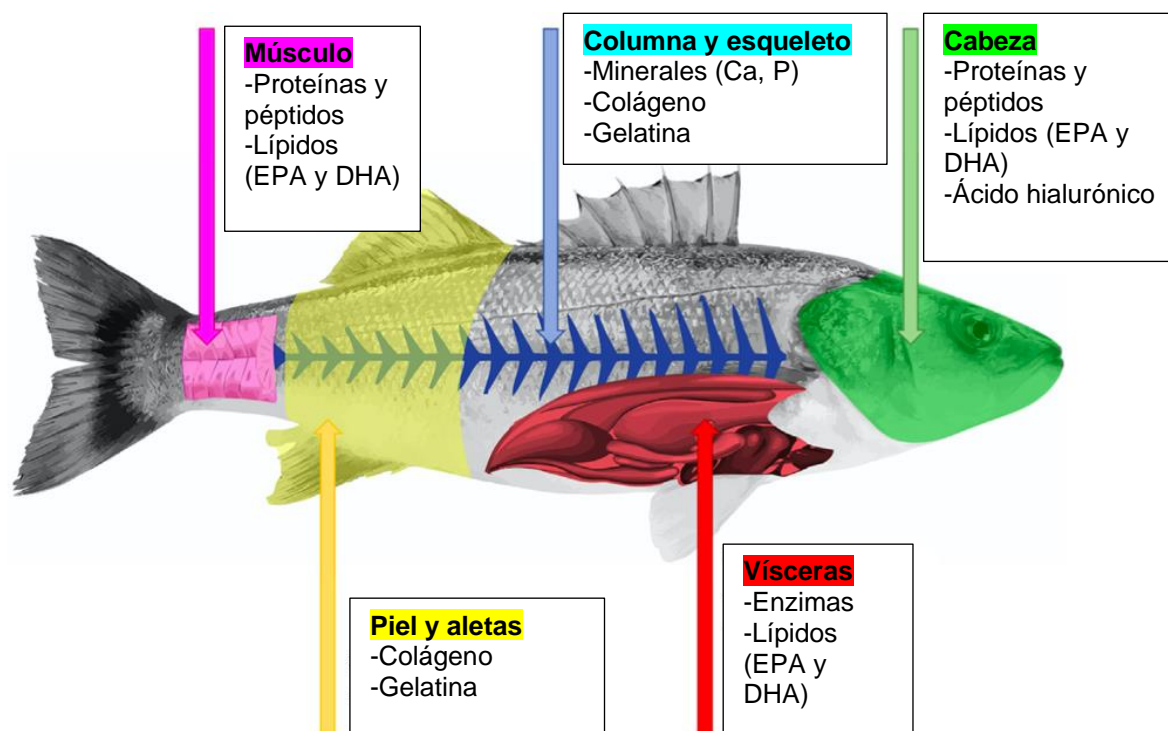


Figura 9. Nutrientes y compuestos bioactivos de interés según el subproducto de pescado donde se encuentran. Modificado de: Martí-Quijal y col., 2020.

1.2.4.1. Proteínas y péptidos bioactivos

Las proteínas de los subproductos de pescado pueden ser el suministro de los aminoácidos esenciales para alimentación humana. Su contenido proteico aproximado es del 70% del peso seco en la mayoría de los casos (Ferraro y col., 2010). La obtención de las proteínas de los subproductos puede realizarse

mediante diversas técnicas: extracción, separación mecánica o hidrólisis, aunque esta última puede dañar a la proteína dando lugar a su oxidación (Shahidi, 2006). Los componentes proteicos que se obtienen de los subproductos de pescado son hidrolizados, surimi, péptidos, aminoácidos, protaminas, colágeno y gelatina; forman parte de la columna del esqueleto, descartes de los cortes, piel, cabezas, fluido seminal, huevas, estómago, vísceras y sangre. La proporción en las que las proteínas se encuentran en los distintos pescados depende de la especie y de la parte del pescado (**Tabla 4**). La cabeza, exoesqueleto, pared abdominal y vísceras tienen un alto contenido nutricional gracias a las proteínas de alta calidad que las conforman (Rustad, 2007 y Olsen y col., 2014). En el caso de los productos precocinados como los enlatados, se ha demostrado la presencia de proteínas y otros extractos en el caldo de cocción que se desechan y podrían ser aprovechadas también en la industria, como es el caso del atún (Gamarro y col., 2013).

Tabla 4. Contenido proteico según la parte del pescado analizada. *Modificado de: Rustad, 2007.*

Parte del pescado	Contenido proteico
Piel	18-35%
Colágeno	10,6-28,8%
Vísceras	7,5-23,9%
Exoesqueleto	13,1-25,3%
Columna y cortes	13-17%

Como se observa en la **Tabla 4**, el contenido proteico de la piel es el mayor de entre todos los subproductos de pescado (18-35%). En el caso de la lubina esta proporción se mantiene con ≈ 25 g/100 gramos y el máximo contenido en aminoácidos esenciales se encuentra tanto en la piel como en el hígado. Estos dos subproductos son la mayor fuente de aminoácidos esenciales en lubina (Munekata y col., 2020).

Una de las alternativas para el uso de proteínas del músculo del subproducto es su hidrólisis y utilización como ingredientes en alimentos o con aplicaciones médicas. La composición en proteínas solubles, péptidos y aminoácidos libres hacen de la proteína hidrolizada un buen ingrediente para alimentación en acuicultura y otros alimentos animales, gracias a la fácil asimilación de estos compuestos. Los hidrolizados son proteínas tratadas enzimáticamente que se

rompen en péptidos de distintos tamaños y moléculas ionizables, es por esto por lo que los hidrolizados son una gran fuente de péptidos bioactivos. Estos tratamientos también se acompañan de tratamiento térmico de calor, en estos se ha demostrado una mejora en la solubilidad, actividad emulsionante, propiedades espumantes y antioxidante. Las características finales de los hidrolizados son dependientes de la especie de la que provengan, el pH al que se ha realizado el tratamiento, la temperatura de hidrólisis, el tiempo y la enzima empleada (Kim y col., 2014, Nguyen y col., 2017 y Vázquez y col., 2019). La obtención del subproducto hidrolizado requiere de un pretratamiento antioxidante de la materia que reduce la cantidad de sustancias ácido tiobarbitúricas-reactivas y los radicales carbonilo, para conseguir la disminución de la oxidación del producto final. En este proceso de obtención de la proteína de pescado hidrolizada es muy importante que los compuestos bioactivos y los nutrientes esenciales no se alteren; es por ello, que hay diversas investigaciones en la actualidad dedicadas a la optimización de este proceso en salmónidos (Nikoo y col., 2019).

En la actualidad existen algunos alimentos enriquecidos con proteínas hidrolizadas, las cuales tienen funciones muy diversas como antiproliferativas, antioxidantes, con actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina y antiinflamatorias (Kim y col., 2014 y Vázquez y col., 2019). La obtención de proteínas hidrolizadas del caldo de cocción de atún se da mediante radiación gamma y presenta propiedades antioxidantes superiores a las de otras partes del atún, siendo su aplicación principal como aditivo funcional en alimentación (Gamarro y col., 2013). En el caso de la aleta pectoral del salmón, se ha conseguido el aislamiento de un tripéptido (PAY) con actividad antiinflamatoria *in vitro* que actúa como agente de los macrófagos e inhibe la producción de citoquinas (Ahn y col., 2015). Las propiedades sensoriales de la proteína hidrolizada se ven afectadas por la presencia de sales minerales, lípidos así como los productos de su oxidación y la trimetilamina entre otros, por lo que la introducción en dietas debe tener en cuenta este factor para no empeorar la palatabilidad del alimento (Aspevick y col., 2016).

Los péptidos bioactivos han mostrado una capacidad antioxidante, antihipertensiva, antiproliferativa y anticoagulante, para el consumo de estos en humanos se deberán realizar estudios sobre su efecto tóxico en la salud que eviten efectos secundarios tras su ingesta (Lorenzo y col., 2018). Los métodos de extracción de estos péptidos son la extracción líquida y la fermentación microbiana de las proteínas. La gelatina se obtiene mediante la desnaturalización del colágeno; su aplicación en distintos productos aporta estabilidad, elasticidad y consistencia. La demanda de colágeno y gelatina en la industria farmacéutica y alimentaria va en aumento, es por ello por lo que las fuentes de estos compuestos han aumentado su valor. El colágeno representa hasta un 30% del contenido proteico total de los pescados (Ferraro y col., 2010). La gelatina del subproducto de pescado se ha de poder obtener mediante técnicas que abaraten su coste para poder presentarse como alternativa a la utilizada hasta ahora, la gelatina de mamíferos (Kim y col., 2014). En la actualidad, la producción de gelatina que proviene de productos acuícolas representa aproximadamente el 2% de la producción global de gelatina (Ramírez, 2013). Esto se debe a que presentan una estabilidad menor, color más oscuro, olor a pescado que el colágeno de mamíferos (Ferraro y col., 2010).

La obtención de las enzimas obtenidas a partir de subproductos de pescado se da mediante microorganismos modificados genéticamente y se aplican comercialmente en investigación en biología molecular y la industria. Algunos ejemplos de las enzimas obtenidas son:

- **Fosfatasa alcalina** de langostino (*Pandalus borealis*) recuperada de agua tratada de langostino y presenta labilidad frente al calor (Olsen y col., 1990)
- **DNA-uracilo glicosilasa** obtenida del hígado de bacalao del Atlántico (Lanes y col., 2000).
- **Calcitonina** del salmón, hormona sintetizada químicamente por farmacéuticas y utilizada como medicamento para enfermedades del esqueleto (Olsen y col., 2014)
- **Pepsina**, utilizada para el procesado de algunos productos piscícolas como el caviar o para el desescamado del pescado.

- **Colagenasa, tripsina, quimiotripsina.**
- **Tranglutaminasa** de bacalao para la producción de surimi.
- **Lipasas** para la producción de poliéster.

Los aminoácidos con mayor valor comercial obtenidos de subproductos de pescado son la taurina y la creatina, los cuales tienen aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica. El mejillón es la fuente principal de taurina, las funciones de esta son muy variadas: osmoregulación, protección antioxidante, estabilización de membrana y detoxificación, entre otras. La creatina se encuentra mayoritariamente en esqueleto y corazón de los pescados, y al igual que la taurina, interviene en diversos procesos fisiológicos y biológicos. Las aplicaciones de la creatina se centran en la industria farmacéutica y alimentaria, y su presentación como producto final es muy variable (geles, chicles, tabletas y líquida) pero la menos costosa y más comercializada es en polvo. Para ambos aminoácidos, su obtención de los subproductos de pescado es muy costosa por lo que generalmente se sintetiza químicamente (Ferraro y col., 2010).

1.2.4.2. Lípidos

Los lípidos del pescado tienen un alto valor por la presencia de ácidos grasos esenciales n3 que otorgan beneficios en la salud de los que lo consumen, actuando sobre i) el sistema cardiovascular por sus efectos antitrombóticos y antiarrítmicos; ii) sobre el sistema inmunológico; iii) sobre el sistema nervioso porque son esenciales en el desarrollo y funcionamiento del cerebro y del sistema nervioso, entre otras cosas y iv) otras enfermedades (González, 2002).

El contenido lipídico en los subproductos de pescado es del 4,3 al 27,8%, variando según la especie. La cabeza, exoesqueleto, pared abdominal y vísceras tienen un alto contenido nutricional gracias a ácidos grasos n3 que las conforman (Rai y col., 2011 y Olsen y col., 2014). La presencia de ácidos grasos poliinsaturados del total de ácidos grasos (10%) en los subproductos de pescados es aproximadamente del 73% en el caso de las truchas, y su valor varía en las distintas especies (**Tabla 5**) (Fiori y col., 2012). La mayor fuente de ácidos grasos poliinsaturados son las microalgas y protistas marinos, seguidos

del krill antártico y los subproductos procedentes de los descartes (Ferraro y col., 2010). Hasta el momento, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) se presentan en el mercado como aceites de pescado comestibles ricos en n3 obtenidos mediante dióxido de carbono supercrítico, *n*-hexano o aceite prensado a partir de los subproductos de la industria del salmón del Atlántico (vientre, descarte del músculo, esqueleto y piel) (Haq y col., 2017).

Tabla 5. Concentración de EPA y DHA en lípidos de diferentes subproductos de pescado.
Modificado de: Fiori y col., 2012.

Subproducto	Porcentaje del total de ácidos grasos (%)		
	EPA c20:5 n3	DHA c22:6 n3	Referencia
Cabeza de trucha arcoiris	7,89	6,26	(Fiori y col., 2012).
Cabeza de caballa	10,34	10,82	(Sahena y col., 2010)
Cabeza de sardina	10,97	13,01	(Létisse y col., 2006)
Vísceras de trucha arcoiris	6,37	6,02	(Fiori y col., 2012).
Vísceras de trucha 'steelhead'	3,35	7,98	(Zhong y col., 2007)
Vísceras de caballa	9,23	9,96	(Sahena y col., 2010)
Vísceras de carpa	3,82	1,20	(Crexi y col., 2010)
Vísceras de bagre	0,28	0,87	(Thammapat y col., 2010)
Vísceras de salmón	7,32	5,66	(Sun y col., 2002)
Espina de trucha arcoiris	8,75	7,30	(Fiori y col., 2012).

El hígado de bacalao es por excelencia una fuente tradicional de n3, los altos niveles de lípidos de la cabeza de salmón (*Salmo salar*) hacen que sea también un gran candidato para la obtención de ácidos grasos esenciales, y todavía están en estudio otras especies como la trucha o la boga como posibles candidatas. En el caso del salmón, el 57% del total de ácidos grasos que conforman el cuerpo del pescado (2%), se trata de ácidos grasos que no pueden ser aprovechados en la industria (Haq y col., 2017). Las especies producidas en piscifactorías tienen un contenido lipídico superior a las salvajes, lo que supone un

posicionamiento de las producidas frente a las salvajes en la obtención de lípidos (Ferraro y col., 2010, Estefanell y col., 2012 y Fiori y col., 2012).

Un estudio realizado en 2018 por Haq y colaboradores sugiere la posibilidad de obtener ácidos grasos poliinsaturados n3 mediante la esterificación enzimática de lípidos de salmón dando lugar a ácidos grasos poliinsaturados enriquecidos con acilgliceroles. Esta técnica presenta una alternativa a la obtención de ácidos grasos n3 para alimentación tanto animal como humana. Además, otros procesos para la obtención de lípidos han sido estudiados: la extracción supercrítica mediante CO₂ y extracción por hexano a presión atmosférica (Fiori y col., 2012). La obtención de lípidos se ve dificultada por su fácil oxidación por lo que se requiere de antioxidantes en su procesamiento (Shahidi, 2006). Además del bajo nivel de oxidación, los lípidos obtenidos necesitan bajos niveles de contaminantes y una calidad consistente para su aplicación en nutracéutica, suplementos alimenticios y alimentación (Kim y col., 2014). Los niveles bajos de oxidación son levemente dependientes de la temperatura durante el proceso de extracción y dependientes del nivel de insaturación del ácido graso, de manera que, a mayor insaturación, mayor posibilidad de oxidación. Esto demuestra la necesidad de establecer unos parámetros determinados en el proceso de extracción (Honold y col., 2016).

Las técnicas de extracción de ácidos grasos poliinsaturados son muy variables: digestión enzimática (obteniendo acilgliceroles), extracción de fluidos supercríticos acoplada o no acoplada a nanofiltración y destilación, estas dos últimas dando lugar a ácidos grasos poliinsaturados esterificados y cromatografía y cristalización a bajas temperaturas, las cuales dan lugar a ácidos grasos poliinsaturados libres. La obtención de acilgliceroles o ácidos grasos esterificados requiere de tratamientos posteriores para dar con los ácidos grasos poliinsaturados (Ferraro y col., 2010).

1.2.4.3. Minerales de los subproductos de pescado

El contenido en minerales en los subproductos de pescado es aproximadamente del 10% del peso seco, siendo superior en el caso de crustáceos (Ferraro y col.,

2010). Los descartes de la industria acuícola como los exoesqueletos y conchas tienen un alto contenido en sales cálcicas, la solubilización de estas puede aplicarse como remedio ante las deficiencias cálcicas en el esqueleto humano (Shahidi, 2006). El esqueleto de los pescados es rico en fosfato hidrogenado de calcio lo que le hace una fuente de calcio (Ca) y fósforo (P) para nutrición humana (Gamarro y col., 2013). El hierro, zinc, selenio y yodo están presentes en los subproductos de pescado. Otro ejemplo de mineral presente en los subproductos de pescado es el hidroxapatito, aproximadamente el 60-70% del contenido total del hueso es este mineral y representa el 43% de los huesos humanos. El hidroxapatito sintético se utiliza en biomedicina, pero las fuentes naturales de este parecen presentarse como una alternativa consistente para su obtención. El modo de extracción habitual del esqueleto de pescado es la hidrólisis alcalinotérmica o la extracción subcrítica con agua (Ferraro y col., 2010).

La mayor fuente de minerales entre los subproductos de lubina son las branquias (5,81 gramos/100 gramos), la cabeza (10,11 gramos/100 gramos) y el esqueleto (7,51 gramos/100 gramos). Tanto el calcio como el fósforo se muestran en una proporción superior en branquias (1,38 gramos/100 gramos y 1,16 gramos/100 gramos, respectivamente) (Munekata y col., 2020).

1.2.4.4. Polisacáridos

La quitina (β -(1 \rightarrow 4)-*N*-acetil-d-glucosamina) es un biopolímero natural muy importante en la industria, las fuentes principales de las que se obtiene son del exoesqueleto de cangrejos y langostinos. La quitina de los langostinos, cangrejos, langostas y cigalas puede recuperarse mediante desproteinización y desmineralización para producir quitosano. La glucosamina del quitosano tiene efectos beneficiosos sobre la salud (Shahidi, 2006). Las aplicaciones de la quitina y el quitosano en la biomedicina son muy variadas, su naturaleza adhesiva junto con su carácter antifúngico y bactericida y su permeabilidad al oxígeno las adecua para el tratamiento de heridas y quemazos. Además, se utiliza en el tratamiento de aguas y pesticida (Ramírez, 2013). El *electrospinning* es la técnica más utilizada para la obtención de nanofibras de quitina (Kim y col.,

2014). Sin embargo, la recuperación de la quitina total presente en el animal es tan solo del 10% aproximadamente, la técnica ha de mejorar para poder adecuarse a los parámetros de calidad determinados para el producto en el que se utilice (Olsen y col., 2014).

La obtención de quitosano a partir de crustáceos es económicamente factible, para su extracción se requiere de HCl, NaOH, nitrógeno y agua. Este proceso se lleva a cabo en India, Japón, Polonia, Noruega y Australia y se comercializa en forma de polvo, pasta o fibra. Su peso molecular hace que la forma de utilización *in vivo* sea principalmente como fibra dietética; cuando el quitosano es tratado y su viscosidad disminuye, su absorción *in vivo* es más fácil y se puede presentar de otras maneras (Ferraro y col., 2010).

1.2.4.5. Vitaminas y pigmentos

Los subproductos son también ricos en micronutrientes como vitaminas A, D, riboflavina y niacina. El aceite de hígado de bacalao es un ejemplo del aprovechamiento de subproductos en la actualidad ricos en vitamina A, D y E y también fuente de n3 (Ferraro y col., 2010 y Olsen y col., 2014). El salmón es una gran fuente de vitaminas y minerales (Haq y col., 2017).

En cuanto a los pigmentos carotenoides, la astaxantina está presente en conchas de crustáceos, representando el 74-89% del pigmento total de la concha. Otra fuente de astaxantina son las células de las algas y en el caso de los peces, pueden presentarse en los integumentos o gónadas o como es el caso del salmón, en el músculo. Sus funciones biológicas como precursora de la vitamina A y capacidad antioxidante, la hacen interesante para la industria farmacéutica y alimentaria. Otra función asociada a la astaxantina es su capacidad hipoglucémica que permite su aplicación en tratamientos contra la diabetes, todavía en estudios en desarrollo. También se asocia a la protección frente a cáncer inducida químicamente, a la degeneración macular y frente a los daños causados por la radiación ultravioleta. En la actualidad, la mayoría de astaxantina producida se trata de astaxantina sintética debido a que es más rentable que obtenerla de los subproductos del pescado (Olsen y col., 2014). Sin

embargo, los pigmentos sintéticos afectan negativamente al medio, por lo que se ha empezado a apostar por las maneras naturales de obtención de los pigmentos. En la acuicultura, los pigmentos carotenoides son necesarios para la presentación del producto de manera que sea atractiva para el consumidor; estos han de ser incorporados en la dieta ya que los peces no pueden resaltar su color *de novo*; esto permite que el desecho tenga un alto contenido en astaxantina (Ferraro y col., 2010; García-Chavarría y Lara-Flores, 2013 y Sila y col., 2015).

1.2.4.6. Bacterias ácido-lácticas de los subproductos de pescado. Propiedades y actividad antifúngica

Los subproductos de pescado no son tan solo ricos en biomoléculas activas, sino que también contienen bacterias beneficiosas que pueden ser aisladas (Leal y col., 2009 y Feliatra y col., 2018). El estudio de cepas probióticas aisladas de peces marinos que actúan contra patógenos de estos está siendo un campo de estudio muy extendido en la actualidad y la lista de cepas aisladas aumenta cada año (Sorroza, 2012).

El interés en investigación sobre las bacterias ácido-lácticas y los metabolitos sintetizados durante la fermentación tienen un gran potencial en la industria de la alimentación gracias a sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes, entre otras. Estas funciones las adecúan para su aplicación como conservantes naturales en alimentación y como alternativas al uso de antibióticos para el tratamiento contra patógenos. La constante pérdida de alimento debido a la actuación de microorganismos que afectan las cualidades organolépticas de este y el riesgo en la salud humana que supone la presencia de estos microorganismos, incrementa el valor en esta área de la investigación (Levy-Salas y col., 2017). La contaminación del alimento por microorganismos patógenos causa aproximadamente 420.000 muertes anuales, siendo la contaminación de bacterias como *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* y *Listeria*, las más incidentes (Rai y col., 2011 y Martí-Quijal y col., 2020).

Las bacterias ácido-lácticas son microorganismos Gram positivos muy heterogéneos morfológica y fisiológicamente. Su presencia en los subproductos

de pescado se da en una mayor proporción en las vísceras y varía de manera estacional, de acuerdo con los cambios de temperatura del agua (Jini y col., 2011). Una de sus características principales es la producción de ácido láctico mediante la fermentación de hexosas para la obtención de energía. Tienen dos tipos de metabolismo: el homofermentativo, en la que solo produce ácido láctico, y el heterofermentativo, en el que produce ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono. Este proceso se realiza a partir de compuestos orgánicos sin utilizar un agente oxidante externo (Sarrazo, 2012).

La fermentación ácido-láctica es una tecnología utilizada para la recuperación de biomoléculas de los residuos sólidos de la industria piscícola. Aplicando este proceso se da la obtención de lípidos y proteínas de los subproductos de pescado, entre otros compuestos. Además, el caldo de fermentación tiene una porción de caldo rica en péptidos de bajo peso molecular con actividades antioxidantes, antifúngicas, y biocidas, entre otras. Las funciones bioactivas de los péptidos sintetizados varían de acuerdo con la secuencia y tipo de aminoácidos y por la longitud de estos. En cuanto a la obtención de lípidos gracias a la producción de la lipasa como metabolito, se obtiene una porción del caldo de fermentación rica en ácidos grasos poliinsaturados (Jini y col., 2011). En el caso de la fermentación de las vísceras, la recuperación de lípidos de interés aumenta aproximadamente a un 85% de su contenido total y es de mayor calidad que el recuperado con ácido fórmico (método químico) (Rai y col., 2011).

La recuperación de biomoléculas mediante fermentación o hidrólisis enzimática de las bacterias ácido-lácticas en la industria va en aumento; esto se debe a la conciencia medioambiental de las empresas que buscan alternativas al uso de químicos que generan un residuo contaminante (Rai y col., 2011 y Martí-Quijal y col., 2020). Al tratarse de bacterias aisladas de especies marinas, su crecimiento en las plantas de procesado del producto acuícola es posible, lo que las adecua para su aplicación industrial (Vallejo y col., 2009).

Un ejemplo de bacteria ácido-láctica con función antifúngica es *Lactobacillus plantarum* aislada de los subproductos de lubina, siendo una posible alternativa a los conservantes químicos habituales. Esta bacteria ácido-láctica actúa contra

hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus* (Rai y col., 2011 y Martí-Quijal y col., 2020). Algunos métodos de actuación de los metabolitos con carácter antifúngico quedan reflejados en la **Figura 10**:

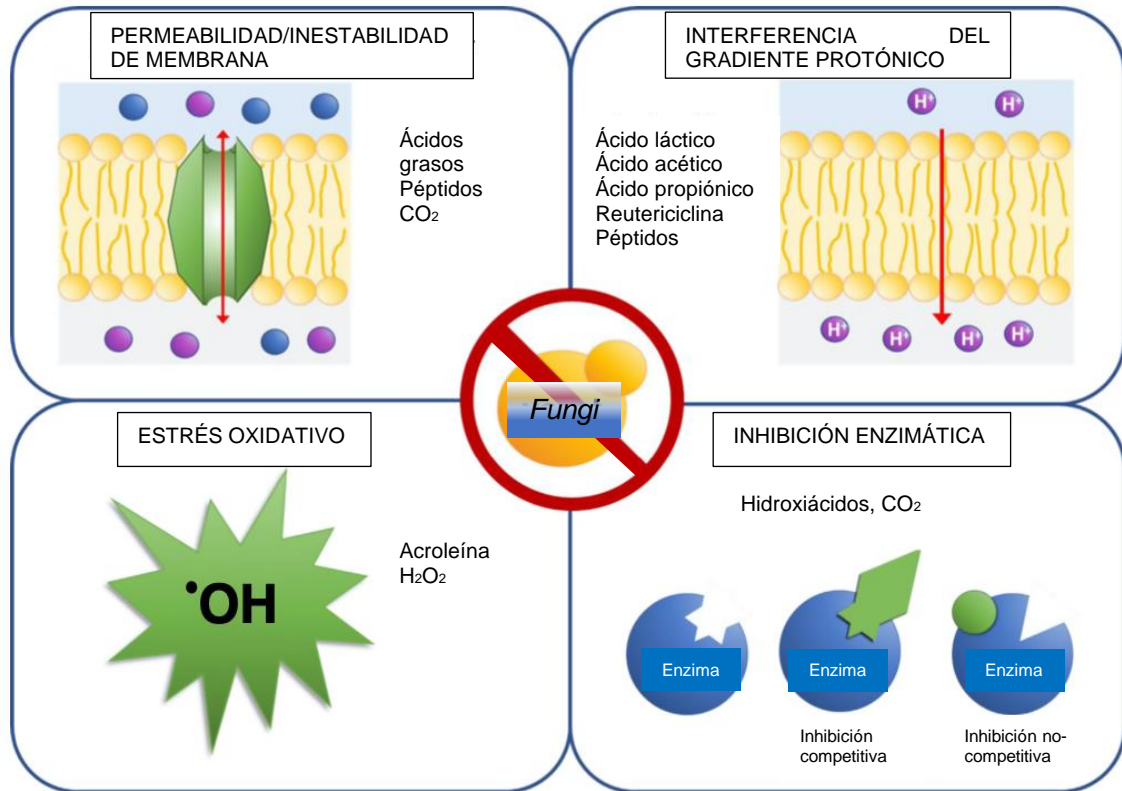


Figura 10. Mecanismos inhibitorios del crecimiento de organismos de Fungi por acción de los metabolitos de la fermentación por bacterias ácido-lácticas. (1) Inestabilidad/permeabilidad de la membrana; (2) interferencia de gradiente protónico; (3) estrés oxidativo e (4) inhibición enzimática. Los metabolitos que intervienen en los procesos son: ácidos grasos, péptidos, dióxido de carbono, ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, reutericina, acroleína, peróxido de hidrógeno e hidroxiacidos. *Modificado de: Siedler y col., 2019.*

Además, los compuestos antioxidantes intervienen en el retraso de la peroxidación de lípidos, mantienen el color y reducen la oxidación de proteínas, estas tres funciones reducirían significativamente la producción de desechos de pescado (Siedler y col., 2019). Algunas de las bacterias ácido-lácticas aisladas de los subproductos de pescado y su actividad principal han sido recogidas en la **Tabla 6**:

Tabla 6. Bacterias ácido-lácticas aisladas de los subproductos de pescado y su actividad principal. (-) Estudio realizado a partir de una bacteria aislada en estudios previos o cepa comprada a una compañía.

Especie	Bacteria aislada	Método de aislamiento	Actividad principal	Referencia
	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Enriquecimiento primario, incubación y cultivo en agar MRS con ácido nalidíxico y cicloheximida.	Efecto inhibitorio contra <i>Listeria monocytogenes</i>	Vallejo y col., 2009.
<i>Odontesthes platensis</i> (pejerrey)	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	Enriquecimiento primario, incubación y cultivo en agar MRS con ácido nalidíxico y cicloheximida.	Efecto inhibitorio contra <i>Listeria monocytogenes</i>	Vallejo y col., 2009.
	<i>Lactobacillus sakei</i>	Enriquecimiento primario, incubación y cultivo en agar MRS con ácido nalidíxico y cicloheximida.	Efecto inhibitorio contra <i>Listeria monocytogenes</i>	Vallejo y col., 2009.
<i>Labeo rohita</i> (rohu)	<i>Enterococcus faecalis</i>	Fermentación en medio MRS con leche desnatada 1%	Actividad proteolítica y lipolítica - actividad antioxidante	Jini y col., 2011.
Mezcla de los subproductos de <i>Labeo rohita</i> , <i>Catla catla</i> , <i>Cyprinus carpio</i> , <i>Oreochromis mossambicus</i> y <i>Cirrhinus mrigala</i> (rohu, catla, carpa común, tilapia y carpa mrigal)	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Fermentación en medio MRS con leche desnatada 1%	Actividad proteolítica y lipolítica - actividad antioxidante	Jini y col., 2011.
<i>Labeo rohita</i> (rohu)	<i>Pediococcus</i>	Fermentación en medio MRS con leche desnatada 1%	Actividad antibacteriana contra <i>Micrococcus</i>	Rai y col., 2011.
<i>Catla catla</i> (catla)	<i>Enterococcus</i>	Fermentación en medio MRS con leche desnatada 1%	Actividad antibacteriana contra <i>Listeria</i> y <i>Micrococcus</i>	Rai y col., 2011.

Tabla 6. (cont).

Espece	Bacteria aislada	Método de aislamiento	Actividad principal	Referencia
<i>Cyprinus carpio</i> (carpa común)	<i>Enterococcus</i>	Fermentación en medio MRS con leche desnatada 1%	Actividad antibacteriana contra <i>Listeria</i> y <i>Micrococcus</i>	Rai y col., 2011.
	<i>Pediococcus</i>	Fermentación en medio MRS con leche desnatada 1%	Actividad antibacteriana contra <i>Micrococcus</i>	Rai y col., 2011.
<i>Oreochromis mossambicus</i> (tilapia)	<i>Enterococcus</i>	Fermentación en medio MRS con leche desnatada 1%	Actividad proteolítica	Rai y col., 2011.
<i>Cirrhinus mrigala</i> (carpa mrigal)	<i>Enterococcus</i>	Fermentación en medio MRS con leche desnatada 1%	Actividad antibacteriana contra <i>Listeria</i> y <i>Micrococcus</i>	Rai y col., 2011.
	<i>Pediococcus</i>	Fermentación en medio MRS con leche desnatada 1%	Actividad antibacteriana contra <i>Listeria</i> y <i>Micrococcus</i>	Rai y col., 2011.
<i>Solea solea</i> (lenguado)	<i>Vagococcus fluvialis</i>	Cultivos en medios diferentes y resiembra aislada de colonias según morfología en TSA	Actuación contra <i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Yersinia ruckeri</i> y <i>Photobacterium damselae subsp. piscicida</i>	Sorroza, 2012.
<i>Sparus aurata</i> (dorada)	<i>Aerococcus viridans</i>	Cultivos en medios diferentes y resiembra aislada de colonias según morfología en TSA	Actuación contra <i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Yersinia ruckeri</i> y <i>Photobacterium damselae subsp. piscicida</i>	Sorroza, 2012.
<i>Sparus aurata</i> , <i>Argyrosomus regius</i> y <i>Dicentrarchus labrax</i> (dorada, corvina y lubina)	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Cultivos en medios diferentes y resiembra aislada de colonias según morfología en TSA	Actuación contra <i>Vibrio anguillarum</i> , <i>Yersinia ruckeri</i> y <i>Photobacterium damselae subsp. piscicida</i>	Sorroza, 2012.
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> y <i>Engraulis encrasicolus</i> (Carpa plateada y anchoa)	<i>Aspergillus oryzae</i>	-	Compuestos aromatizantes	Kasankala y col., 2012. Y Sun y col., 2016.

Tabla 6. (cont).

Espece	Bacteria aislada	Método de aislamiento	Actividad principal	Referencia
<i>Gadus morhua</i> y <i>Thunnus alalunga</i> (Bacalao y atún blanco)	<i>Lactobacillus curvatus</i> and <i>Enterococcus faecium</i>	Cultivo en medio MRS a 30°C durante 16 h con agitación moderada	Péptidos conservantes con interés antibacteriano.	Gómez-Sala y col., 2016.
<i>Rasbora argyrotenia</i> (Carpa)	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Detectada y aislada del <i>bekasam</i>	Obtención péptido inhibidor de HMG-CoA y lovastatina	Rinto y col., 2017.
<i>Scophthalmus maxima</i> (Rodaballo)	<i>Aspergillus oryzae</i>	Aislada de salsa koji y almacenada con glicerol al 20% a -80°C. Activada en medio PDB a 30°C durante 48 h a 180 rpm.	Obtención péptidos antioxidantes	Fang y col., 2017.
Peces de agua dulce	<i>Aspergillus oryzae</i> y <i>Aspergillus niger</i>	-	Obtención de ácido glutámico, 2-metilbutanal y 3-metilbutanal	Zhao y col., 2017.
<i>Dicentrarchus labrax</i> (Lubina)	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Enterococcus gallinarum</i> y <i>Streptococcus spp.</i>	-	Recuperación de lípidos mediante fermentación	Özyurt y col., 2017.
<i>Ctenopharyngodon idellus</i> (Carpa)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Identificación de la bacteria en sopa <i>kimchi</i> por análisis génico 16sRNA.	Recuperación de calcio mediante fermentación	Tang y col., 2018.
<i>Ictalurus punctatus</i> y <i>Oreochromis niloticus</i> (Bagre y tilapia)	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Cultivo de crecimiento <i>Lactobacilli</i> MRS a 37°C durante 24 h.	Ácido láctico	Shi y col., 2018.
<i>Penaeus monodon</i> y <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (langostino tigre y gamba de agua dulce)	<i>Lactococcus lactis</i>	-	Bactericida contra <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> y <i>Pseudomonas stutzeri</i>	Feliatra y col., 2018.

Tabla 6. (cont).

Espece	Bacteria aislada	Método de aislamiento	Actividad principal	Referencia
<i>Penaeus monodon</i> y <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (langostino tigre y gamba de agua dulce)	<i>Bacillus</i>	-	Bactericida contra <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> y <i>Pseudomonas stutzeri</i>	Feliatra y col., 2018.
<i>Penaeus monodon</i> y <i>Macrobrachium rosenbergii</i> (langostino tigre y gamba de agua dulce)	<i>Clostridium</i>	-	Bactericida contra <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> y <i>Pseudomonas stutzeri</i>	Feliatra y col., 2018.
<i>Dicentrarchus labrax</i> (lubina)	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Medio de agar bilis glucosa con cristal violeta y rojo neutro (VRGBA) a 37°C durante 18-24 h. Plaqueo en MRS con cicloheximida a 30°C durante 2-4 días.	Obtención reuterina (conservante)	Angiolillo y col., 2018.
<i>Dicentrarchus labrax</i> (lubina)	<i>Lactobacillus Plantarum</i>	Cultivo en medio MRS a 37°C en condiciones de anaerobiosis	Actividad antifúngica contra <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> y <i>Fusarium</i>	Martí-Quijal y col., 2020.

El deterioro de las características físicas como la apariencia, la textura, el olor y el sabor es uno de los indicios de la contaminación por microorganismos del alimento. La actuación de los hongos sobre la calidad del alimento no es el único efecto negativo de estos, además, algunos géneros de hongos sintetizan metabolitos con efecto tóxico sobre los humanos y animales, también conocidos como micotoxinas. Son las micotoxinas sintetizadas por hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* unas de las más toxigénicas y, por lo tanto, las más estudiadas en la actualidad. Se estima que entre un 5-10% de los alimentos totales se pierden anualmente por el efecto de hongos. Es por esto por lo que el control sobre los hongos es crucial durante todo el proceso de producción, empaquetamiento y distribución del alimento para evitar pérdidas humanas y económicas. La utilización de fungicidas químicos que se ha dado

hasta la fecha ha resultado en algunos casos en su acumulación en los alimentos por sus largos periodos de degradación. Además, algunas cepas han mostrado resistencias a los fungicidas químicos, lo cual acentúa la necesidad de encontrar alternativas a estos. Las restricciones actuales en el uso de químicos que puedan dañar la salud de los consumidores han hecho que se exploren nuevas áreas de obtención de antifúngicos que presenten una total inocuidad en humanos (Veras y col., 2016, Leyva Salas y col., 2017, Song y col., 2017, Dutta y col., 2018 y Sadiq y col., 2019).

La existencia de péptidos antifúngicos producidos por bacterias ácido-lácticas durante la fermentación comprenden tanto péptidos ribosomales como no ribosomales, y también péptidos resultantes de la hidrólisis enzimática de las proteínas. Los péptidos antifúngicos tienen una actividad concreta contra las infecciones de hongos y forman parte de los péptidos antimicrobianos. En la actualidad, ya se han purificado algunos péptidos antifúngicos y alguno de ellos se han obtenido de los caldos de fermentación de los subproductos de pescado fermentados por bacterias ácido-lácticas. Esto último es el caso del péptido *TFNTPAMYVAIQAVLSLYASGR* obtenido de la fermentación de subproductos de corvina espinosa (*Collichthys lucidus*) que mostró una actividad antifúngica contra *Pestalotiopsis sp.* (Song y col., 2017 y Siedler y col., 2019). Los compuestos antifúngicos sintetizados durante la fermentación por bacterias ácido-lácticas son péptidos o proteínas muy variadas que tienen distintos modos de acción, masas moleculares y propiedades bioquímicas. Los péptidos sintetizados en este proceso dependen de las condiciones de fermentación: pH, temperatura, nutrientes y competitividad. El conocimiento exacto de cómo modular la síntesis de estos péptidos en la fermentación permitirá obtener los caracteres que buscamos en el producto (Sousa y col., 2019).

Entre los distintos métodos de preservación, la fermentación es el proceso más utilizado. Los procesos por los que pasa en la fermentación permiten la acidificación, la gelificación de las proteínas del músculo y la degradación de proteínas y lípidos. Es en la acidificación donde se producen estas sustancias antimicrobianas que reducen el riesgo de deterioro en el proceso *post mortem* del pescado. La fermentación es una tecnología aplicada en el pescado en

distintas partes del mundo, sin embargo, el poco conocimiento que se tiene sobre la acción de los microorganismos durante el proceso hace que todavía sea una metodología por explorar y de la que obtener mayores beneficios aparte de la conservación. Un ejemplo de esto es la fermentación como herramienta para obtener compuestos de valor añadido, como es el caso de la fermentación de los subproductos de pescado (Martí-Quijal y col., 2020, Zang y col., 2020 y Xu y col., 2020).

Las bacterias ácido-lácticas pueden considerarse una herramienta biotecnológica gracias a las sustancias sintetizadas en su metabolismo primario y secundario. De entre todas las alternativas ecológicas, son estas bacterias las que se presentan como mejores candidatas para actuar como antifúngicas. El escalado del laboratorio a la industria necesita de la optimización del proceso, una reducción de los costes y estudios que acrediten la inocuidad del uso de estas bacterias para el consumo humano (Sadiq y col., 2019 y Sousa y col., 2019).

Las bacterias con mayor potencial industrial son aquellas que sintetizan péptidos con mayor potencial antifúngico en la fermentación, estas son las del género *Lactobacillus*; las cuales actúan contra un amplio número de hongos (Sousa y col., 2019). Los compuestos con carácter antifúngico pueden considerarse biopreservantes. Estos permiten que se alargue el proceso de deterioro del alimento y mejoran la seguridad de los alimentos mediante el uso de compuestos antimicrobianos naturales; se trata de una solución ecológica e inocua para la conservación de los alimentos, dado que las bacterias ácido-lácticas son aptas para el consumo humano. De entre todas las bacterias ácido-lácticas, en la actualidad destaca *Lactobacillus plantarum* por su actividad antifúngica y por su participación en la inhibición del crecimiento de muchas especies de hongos. Diferentes cepas de esta especie sintetizan metabolitos antifúngicos diferentes (Reginensi y col., 2016, Cortés-Sánchez y col., 2018 y Sadiq y col., 2019).

La demanda de alimentos naturales, seguros y poco procesados está cada vez más presente en el mercado. Las bacterias ácido-lácticas sintetizan distintos

compuestos bioconservantes durante la fermentación que tienen carácter antifúngico:

- **Ácidos orgánicos.** Tanto la homofermentación como la heterofermentación sintetizan ácidos orgánicos que reducen el pH ambiental y previenen del crecimiento de algunos patógenos, entre ellos, los hongos (Jini y col., 2011). Los métodos de actuación de los ácidos orgánicos contra los microorganismos son muy variados: inhibir el transporte activo de la membrana, reducir el pH intracelular, afectar las funciones metabólicas y desequilibrar mantenimiento de la membrana celular, pero el más destacado es la inhibición del crecimiento micelial y el impedimento de la producción de micotoxinas (Reginensi y col., 2016 y Sadiq y col., 2019). Los ácidos orgánicos que actúan contra *Fungi* son:
 - Ácido acético. Se considera el metabolito más efectivo contra hongos de los sintetizados por las bacterias ácido-lácticas.
 - Ácido benzoico y benzoato de sodio.
 - Ácido propiónico. Presenta efecto sinérgico junto con el ácido acético en su actividad antifúngica.
 - Ácido láctico. Pese a ser el sintetizado en mayor cantidad por las bacterias ácido-lácticas, de entre los ácidos orgánicos presenta el carácter antifúngico menor.
 - Ácido fenil-láctico. Su carácter antifúngico se presenta tan solo a altas concentraciones, lo que lo hace menos apto para su utilización a nivel industrial. La producción natural de este compuesto por parte de las bacterias ácido-lácticas no es suficiente para inhibir de manera natural el crecimiento de algunos hongos.

- **Diacetil y acetaldehído.** Estos compuestos se sintetizan en baja concentración durante la fermentación, por lo que su contribución a la inhibición del crecimiento de los hongos es baja y su aplicación en la industria como bioconservante está limitada.

- **Peróxido de hidrógeno.** Las bacterias ácido-lácticas producen este compuesto por distintos mecanismos. El efecto antifúngico se debe a la oxidación de los grupos tiol que causan la desnaturalización de las enzimas y por la peroxidación de los lípidos de membrana.
- **Reuterina.**
- **Péptidos antifúngicos.** Sintetizados durante la fermentación como metabolito secundario o resultantes de la proteólisis. La síntesis de péptidos suficientes por parte de las bacterias ácido-lácticas para poder inhibir el crecimiento de los hongos de manera completa todavía está en estudio (Tirloni, 2014, Reginensi y col., 2016 y Sadiq y col., 2019).

La actuación de algunos de estos compuestos es sinérgica, es decir, la actuación conjunta de todos ellos amplifica la respuesta antifúngica que daría cada uno por separado. Una característica fundamental para la aplicación en la industria de estos metabolitos es su estabilidad durante las condiciones de procesamiento, lo que permite que puedan mantenerse activas durante todo el proceso (Cortés-Sánchez y col., 2018 y Siedler y col., 2019). La producción de estos compuestos depende de las bacterias ácido-lácticas empleadas para la fermentación, la composición del caldo de fermentación y las condiciones de crecimiento (Özcelik y col., 2016 y Sadiq y col., 2019).

En ocasiones, las condiciones determinadas en el laboratorio no se pueden ajustar a nivel industrial, por lo que las bacterias no sintetizan la cantidad de metabolitos necesaria para inhibir el crecimiento de los hongos o no se encuentran con las condiciones necesarias para hacerlo. Muchos estudios se han centrado en investigar el carácter antifúngico de un compuesto sintetizado por una cepa, sin embargo, no se conoce un marcador molecular que permita detectar en el futuro la capacidad antifúngica de otras bacterias ácido-lácticas (Sadiq y col., 2019).

2. Justificación y objetivos

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Máster es la valorización de los desechos de lubina con el fin de obtener subproductos con futuras aplicaciones industriales. Esto se llevará a cabo mediante tres objetivos específicos:

- Determinación de composición de aminoácidos de los desechos de lubina.
- Determinación de lípidos y ácidos grasos de los restos de lubina.
- Análisis de la actividad antifúngica de los componentes del caldo de fermentación de los subproductos de lubina por bacterias aisladas de las mismas.

3. Material y métodos

3.1. Muestras

La determinación de macronutrientes (proteína bruta, grasa bruta, materia seca y cenizas), junto con la de aminoácidos y ácidos grasos, se realizó a partir de los descartes de lubina ecológica de 600-800 gramos (lubina entera sin filetes) procedentes de la empresa Frescamar de Burriana (Castellón).

En la determinación de la actividad antifúngica, se emplearon tres lubinas enteras y frescas, compradas en un mercado local (Valencia, España). Se mantuvieron a -4 °C hasta su disección, se separaron los filetes y se mantuvieron los descartes (cabeza, vísceras, piel, cola, aletas y espina), los cuales pesaron 941 gramos.

3.2. Microorganismos

Las bacterias utilizadas para el estudio de la actividad antifúngica fueron aisladas en estudios previos por Martí-Quijal y colaboradores, 2020, de subproductos de lubina (colon, intestino delgado y estómago). Las bacterias aisladas seleccionadas para el estudio fueron aquellas con una alta capacidad proteolítica y se nombraron: E3, E4, E7 (aisladas de estómago) y C8 (aislada de colon).

En cuanto a la determinación de la actividad antifúngica, los hongos se obtuvieron de cepas de *Aspergillus parasiticus* y *Penicillium expansum* y *P. flavus*, de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT Valencia, España). Las cepas de *Fusarium* se obtuvieron de la Colección de Cultivos Microbianos del instituto de Ciencias y de Producción de Alimentos (Bari, Italia). La última cepa de *Penicillium verrucosum* se obtuvo del Centro de investigación Técnica VTT de Finlandia (Turku, Finlandia) (Martí-Quijal y col., 2020).

3.3. Análisis de macronutrientes

Para la obtención de materia seca, se utilizaron de 1,5 a 2 gramos de pez triturado y se pusieron en un crisol debidamente marcado y pesado. A

continuación, las muestras se metieron en la estufa a 105°C durante 24 horas y pasado el tiempo se pesaban.

En cuanto a la obtención de cenizas, los crisoles con materia seca se metían en una mufla a 550°C durante 6 horas. Pasado este tiempo, se dejaba enfriar la muestra y se pesaban los crisoles (**Figura 11**).



Figura 11. Crisoles utilizados para la estimación de MS y cenizas.

Para la determinación del porcentaje de materia grasa se ponían alrededor de 0,5 g de materia seca liofilizada en filtros bolsillo ANKOM que posteriormente se sellaban y llevaban al extractor ANKOM para retirar la materia grasa (**Figura 12**).



Figura 12. Extractor de solventes marca ANKOM.

Al cabo de una hora se retiraban los filtros del instrumento y se dejaban secar por 4 horas en la estufa para su posterior pesaje.

Para saber el porcentaje de proteínas, se pesaron alrededor de 0,17 g de materia seca liofilizada de pez y se pusieron en papel de aluminio. Posteriormente, se pusieron en un rack plástico y se analizaron en el determinador de carbono/hidrógeno/nitrógeno LECO serie 628 (**Figura 13**).

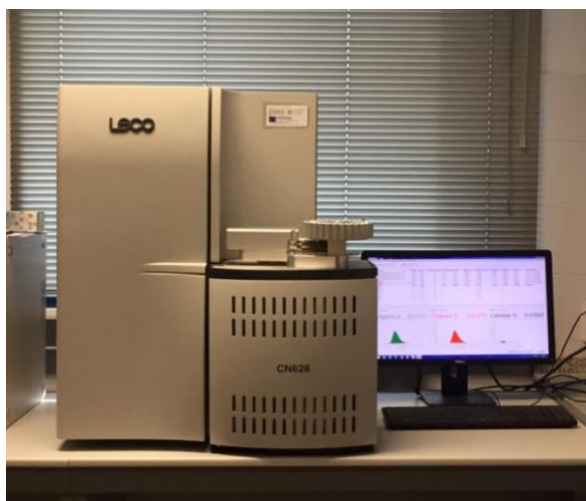


Figura 13. Cromatógrafo LECO serie 628.

3.4. Determinación de aminoácidos

La determinación de aminoácidos totales se realizó por el método descrito por Liu y col. (1995). Para determinar los aminoácidos sulfurados (cisteína y metionina) se realizó una oxidación previa con ácido perfórmico. Las muestras fueron analizadas en HPLC y se usó ácido alfa-aminobutírico como patrón.

3.5. Determinación de lípidos y ácidos grasos

El análisis del perfil de ácidos grasos de cada muestra se realizó mediante un método físico basado en una cromatografía gaseosa que permite separar mezclas de sustancias complejas para conseguir su identificación y cuantificación. Para ello, es necesario obtener obtener ésteres metílicos a partir de dichos ácidos grasos. Gracias a esta reacción de esterificación se transformarán los ácidos grasos en derivados volátiles. Siguiendo el método O'Fallon y col. (2007) se pesaron 30 mg de grasa, se añadió en tubo de Pyrex de 15 ml, 1 ml de patrón (2mg/ml de C21 en hexano) y se evaporó con nitrógeno seco y se añadió la grasa (O'Fallon, Busboom, Nelson, & Gaskins, 2007). El siguiente paso fue la separación de los ésteres metílicos y comparación de los tiempos de retención con un patrón suministrado por Supelco. Gracias a los picos resultantes obtenidos en los cromatogramas, se pudieron transformar en gramos de ácidos grasos por cada 100 g de muestra.

3.6. Determinación actividad antifúngica

Para la determinación de la actividad antifúngica de los compuestos del caldo de fermentación de las bacterias ácido-lácticas tras 72 horas de fermentación, se preparó el caldo donde se inocularon las bacterias ácido-lácticas seleccionadas (E3, E4, E7 y C8) para llevar a cabo la fermentación. El ensayo se realizó contra hongos del género *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*.

Para la preparación del caldo se realizó una dilución 1:3 con los descartes de lubina (941 gramos) y agua destilada (1,8 litros), se autoclavó la preparación (121°C, 21 minutos) y en una campana de seguridad microbiológica se filtró la mezcla para eliminar sólidos y trozos más grandes de la dilución.

Tras la preparación del caldo se inoculó 1 ml de bacteria en el caldo realizado a partir de los subproductos de lubina (10 ml). Se realizaron dos ensayos paralelos: (i) la fermentación en caldo de cultivo de subproducto de lubina y (ii) la fermentación en caldo de cultivo de subproducto de lubina con 5% de glucosa. Todos los pasos posteriores se realizaron para las 4 bacterias y el control en el ensayo de la fermentación en caldo de cultivo de subproducto de lubina con 5% de glucosa, excepto la determinación de pH que se realizó para las dos réplicas. Las condiciones de crecimiento fueron 37°C durante 3 días.

El estudio de crecimiento de cada cepa se realizó a tiempo 0 (nada más inocular las bacterias) y a tiempo 72 horas. Para ello se utilizó 1 ml del caldo inoculado y 9 ml de agua de peptona. Se realizaron diluciones seriadas para facilitar su conteo y se plaquearon (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) a tiempo 0 y a tiempo 72 horas (10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9}). Las bacterias plaqueadas se dejaron crecer durante 5 días a 37°C y se realizó su conteo. También se determinó el pH del caldo de fermentación a tiempo 0 y 72 horas y se realizó un test ANOVA para mostrar diferencias significativas a un p-valor 0,05 entre el descenso de pH observado en el caldo de fermentación de cada bacteria y el caldo del control.

Por último, se realizó una liofilización del caldo de fermentación de subproductos de lubina con glucosa al 5% obtenido de las cuatro bacterias ácido-lácticas aisladas de subproductos de lubina; este procedimiento se llevó a cabo con el

fin de obtener un producto más concentrado y estable con el que poder trabajar. Las etapas de la liofilización son: congelación, secado primario por sublimación de hielo, secado secundario y almacenamiento del producto seco en condiciones controladas (Ramírez-Navas, 2006). Para la liofilización se realizó la centrifugación del caldo de fermentación a 4000 rpm, durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se pasó a un bote de orina y se congeló hasta que se procediese al liofilizado. Para el liofilizado previamente se mantuvo a -80°C durante 2 horas y después se liofilizó. Con el liofilizado obtenido se realizó una dilución 1:4 con agua de peptona.

Tras la preparación de las diluciones, se realizó la siembra de distintos hongos de los géneros *Aspergillus* (A96 y A146), *Fusarium* (F880 y F883) y *Penicillium* (P151 y P95) en medio de cultivo sólido en placa (PDA) específico para crecimiento de hongos. Para facilitar el crecimiento de los hongos, un bastoncillo se sumergió en agua por la parte del algodón. Se realizaron pocillos en el medio y se inocularon 100 µL del liofilizado resuspendido en agua de peptona y 100 µL del control. Tras un periodo de 24 horas en estufa a 37°C se observó el halo de inhibición de las bacterias en las placas. El mayor halo de inhibición muestra la bacteria con mayor capacidad antifúngica.

4. Resultados y discusión

4.1. Macronutrientes

En primer lugar, se evaluó el contenido de macronutrientes de los subproductos procedentes de lubina, obteniendo valores de 7,43 g/100 g, 36,06 g/100 g y 57,00 g/100 g para cenizas, proteínas y grasa, respectivamente (**Tabla 7**).

Tabla 7. Composición nutricional de los restos de lubina en seco. Expresado en g/100 g

Especie	Cenizas	PB	GB
RESTOS DE LUBINA	7,4	36,1	57,0

Como se observa en la **Tabla 7**, la grasa bruta es la que se presenta en mayor proporción por cada 100 gramos de restos de lubina, con un contenido superior a la proteína bruta y a los minerales, lo cual es normal teniendo en cuenta la gran cantidad de grasa mesentérica que posee la lubina y que estaba incluida en los

restos analizados. Estos resultados son similares a los obtenidos por Munekata y colaboradores, 2020, donde se determinó la proporción de minerales, proteínas y grasas de cada subproducto obtenido de los restos de la lubina: 5,8-10,1 g/100 g restos de lubina, 25,3 g/100 g restos de lubina y 37,3–53,1 g/100 g restos de lubina, respectivamente.

4.1.1. Aminoácidos

Asimismo, también se evaluó el potencial de los descartes de lubina como fuente de aminoácidos. Tal y como se muestra en la **Tabla 8** la composición aminoacídica por 100 gramos de lubina es de 38 gramos, es decir, el nivel proteico de la parte no comestible de la lubina es casi del 40%, como se ha visto en el apartado anterior, un valor realmente alto y con grandes posibilidades de uso. Estos resultados se muestran de acuerdo con estudios previos que han observado un gran contenido proteico presente en lubina (Munekata y col., 2020).

Tabla 8. Contenido en aminoácidos (g) por cada 100 gramos de restos de lubina ecológica.

Aminoácidos g/100 g muestra	LUBINA
AC. ASPÁRTICO	3,26
SERINA	1,79
AC. GLUTÁMICO	6,08
GLICINA	5,25
HISTIDINA	0,71
ARGININA	3,11
TREONINA	1,49
ALANINA	2,60
PROLINA	2,49
CISTEINA	Trazas
TIROSINA	0,82
VALINA	1,69
METIONINA	1,01
LISINA	2,39
ISOLEUCINA	1,55
LEUCINA	2,30
FENILALANINA	1,29
Suma total	38

Por otra parte, también cabe reseñar el alto contenido en aminoácidos no esenciales ácido glutámico, glicina, y ácido aspártico y del aminoácido esencial arginina. Los resultados obtenidos en el presente estudio se muestran de acuerdo con los obtenidos por otros autores, los cuales observaron que el ácido glutámico es el aminoácido no esencial predominante en lubina (Baki y col., 2015 y Munekata y col., 2020). El ácido aspártico, al igual que en los resultados obtenidos, se muestra como el segundo aminoácido con mayor presencia en los subproductos de lubina (entre 8,25-9,14% de la proteína) en el estudio de Munekata y colaboradores, 2020. Y en el estudio realizado por Baki y colaboradores, 2015, el ácido aspártico es también el segundo aminoácido no esencial con mayor presencia en los subproductos de lubina.

En cuanto a los aminoácidos esenciales, se observa que la arginina es el aminoácido esencial con mayor presencia en los subproductos de lubina (3,1% de los restos de lubina). Sin embargo, en el estudio realizado por Baki y colaboradores, 2015, la lisina ocupa este lugar; en los resultados del estudio se muestra una presencia de lisina del 2,4% de los restos de lubina. Además, también se cuenta con la presencia de otros aminoácidos esenciales como la metionina (1,01% de los restos de lubina). Por último, la leucina también es uno de los aminoácidos principales de acuerdo con los tres estudios comparados (Baki y col., 2015 y Munekata y col., 2020). La presencia de la arginina, lisina y metionina en los subproductos de lubina tiene un gran interés debido a su deficiencia en las fuentes vegetales. Esto es importante para su aplicación como fuente de aminoácidos esenciales para piensos con el fin de cubrir los déficits de las fuentes vegetales.

4.1.2. Ácidos grasos

En el estudio también se determinó el contenido de ácidos grasos en muestras de restos de lubina ecológica, observando que el ácido oleico fue el ácido mayoritario en la muestra (**Tabla 9**). También cabe destacar el alto contenido de EPA (1,559 g/100 g muestra) y DHA (3,503 g/100 g muestra) en lubina, representando el 3,3% y 7,42% del total de ácidos grasos, respectivamente.

Tabla 9. Contenido de ácido graso (g) por cada 100 gramos de restos de lubina. Amarillo: muestran los valores de EPA y DHA. Verde: Total de ácidos grasos por cada 100 gramos de restos de lubina.

g ácido graso/ 100 g de muestra	LUBINA
C6 Caprónico	0,000
C8 Caprílico	0,000
Cáprico (C10:0)	0,000
Láurico (C12:0)	0,000
Tridecanoico (C13:0)	0,578
Ácido mirístico (C14:0)	1,528
Ácido miristoleico(C14:1)	0,016
Ácido pentadecanoico (C15:0)	0,134
Ácido palmítico (C16:0)	7,416
Ácido palmitoleico (C16:1)	1,819
Ácido heptadecanoico (C17:0)	0,125
Ácido cis-10-Heptadecenoico (C17:1)	0,130
Ácido esteárico (C18:0)	1,493
Ácido elaídico (C18:1n9t)	0,058
Ácido oleico (C18:1n9c)	11,279
Vacénico 18:1(n-7)	1,950
Ácido linoleico (C18:2n6c)	7,860
Ácido araquídico (C20:0)	0,164
Ácido gamma-Linolenico (C18:3n6)	0,028
Ácido cis-11-Eicosenoico (C20:1)	1,920
Ácido Linolénico (C18:3n3)	1,478
Ácido cis-11,14-Eicosadienoico (C20:2)	0,718
Ácido Behenico (C22:0)	0,015
Ácido cis-8,11,14-Eicosatrienoico (C20:3n6)	2,190
Ácido Erúcico (C22:1n9)	0,000
Ácido cis-11,14,17-Eicosatrienoico (C20:3n3)	0,068
Ácido Araquidónico (C20:4n6)	0,212
Ácido cis-13,16-Docosadienoico (C22:2)	0,000
Ácido Lignocerico (C24:0)	0,000
Ácido cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico (C20:5n3) EPA	1,559
Ácido Nervonico (C24:1)	0,298
Ácido cis-7,10,13,16-Docosatetraenoico (22:4n-6)	0,083
Ácido cis-7,10,13,16,19-Docosapentaenoico (22:5n-3)	0,515
Ácido cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoico (C22:6n3) DHA	3,503
TOTAL ÁCIDOS GRASOS	47,14

El contenido en ácidos grasos está de acuerdo con los obtenidos por otros autores en subproductos de lubina, los cuales también observaron que el ácido oleico fue el ácido graso mayoritario en las muestras de lubina, seguido por el ácido palmítico y linoleico (Munekata y col., 2020). Los resultados obtenidos por Munekata y sus colaboradores en 2020 muestran que en lubina la mayor fuente de lípidos son el intestino y el estómago (37,25% y 53,12%, respectivamente) y los ácidos grasos n3 presentes están entre 10,85-14,10% del total de ácidos grasos, resultados superiores a los obtenidos en este trabajo. En animales marinos, tanto el EPA como el DHA son considerados ácidos grasos esenciales, es por ello por lo que el contenido de estos en los subproductos de lubina también es interesante para la producción de piensos y para alimentación humana debido a que los productos marinos son una fuente exclusiva de n3.

4.2. Crecimiento de bacterias y determinación de pH

Los resultados obtenidos en el conteo mostraron que a las 72 horas el crecimiento no había sido muy diferente al determinado a tiempo 0. La realización del estudio a tiempo 72 horas con diluciones mayores tenía como objetivo poder encontrar un menor número de colonias que a una dilución 10^{-4} a las 72 horas y así, facilitar el trabajo. Además, la dilución 10^{-4} de la cepa E7 a tiempo 0 horas muestra un número de colonias que no se corresponde con el observado en diluciones mayores, por lo que quizás nos encontramos ante un error en la metodología. En el control no se mostró ningún crecimiento de acuerdo con lo esperado (**Tabla 10**).

Tabla 10. Resultado conteo cepas E3, E4, E7 y C8 plaqueadas a tiempo 0 y 72 horas. 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} son las diluciones realizadas; +++: más de 1000 colonias; /: ninguna colonia.

	Tiempo 0 horas			Tiempo 72 horas		
	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
C8	+++	733	99	/	/	/
E3	923	467	34	3	/	/
E4	774	747	89	7	/	/
E7	50	336	63	10	/	/
Control	/	/	/	/	/	/

Se determinó el pH a tiempo 0 y a tiempo 72 horas, en esta última medida se determinó el valor de pH de las dos réplicas: (I) caldo de subproductos de lubina y (II) caldo de subproductos de lubina con glucosa al 5% (**Figura 14**).

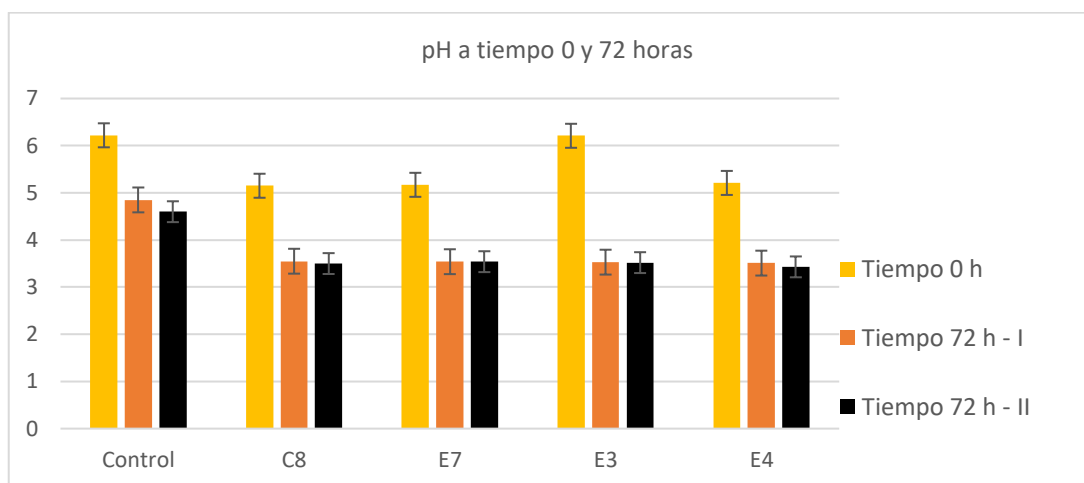


Figura 14. Descenso de pH caldo de cultivo por fermentación de bacterias ácido-lácticas. Las bacterias ácido-lácticas son C8, E7, E3 y E4. El control es tan solo el caldo de lubina. Las determinaciones fueron a tiempo 0 y 72 horas (tiempo 72 h - I: caldo de subproductos de lubina; tiempo 72 h - II: caldo de subproductos de lubina con glucosa al 5%).

Tal y como se observa en la **Figura 14**, hubo un descenso del pH entre el tiempo 0 y 72 horas, sin embargo, la prueba ANOVA mostró que no había diferencias significativas entre el descenso de pH observado en el caldo de fermentación de cada bacteria y el caldo del control a un p-valor de 0,05. También se observó una disminución del pH en el control, lo cual no se esperaba por la ausencia de bacterias ácido-lácticas en el medio de cultivo. En estudios posteriores se evaluará el descenso de pH con un caldo de subproductos de lubina con una composición diferente.

4.3. Actividad antifúngica

Para el estudio de la actividad antifúngica se utilizó el fermento (dilución 1:4, v/v) con agua de peptona. El término “fermento” se refiere a una preparación en polvo derivada del producto fermentado en la cual pueden encontrarse tanto los microorganismos fermentadores (bacterias ácido-lácticas), como sus componentes, sobrenadantes del caldo fermentado, sustratos fermentados y una gran variedad de metabolitos y componentes bioactivos. Los beneficios atribuidos a este fermento se relacionan con los componentes bioactivos presentes más que con los efectos directos de las cepas de bacterias (Mathur y

col., 2020). Uno de los métodos de obtención de este preparado es la liofilización. La liofilización es “el proceso de estabilización en el cual el material primero se congela y se concentra el solvente, comúnmente el agua, reduciéndolo mediante sublimación y desorción, a niveles que no sostendrán más el crecimiento biológico o las reacciones químicas” (Ramírez-Navas, 2006)

En el estudio de la actividad antifúngica no se observaron halos de inhibición (Figura 15), es por ello por lo que no se puede demostrar la actividad antifúngica de las bacterias ácido-lácticas con estos resultados contra estas cepas de hongo de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. En posteriores estudios se reformulará el caldo de fermentación con el objetivo de obtener compuestos con carácter antifúngico.

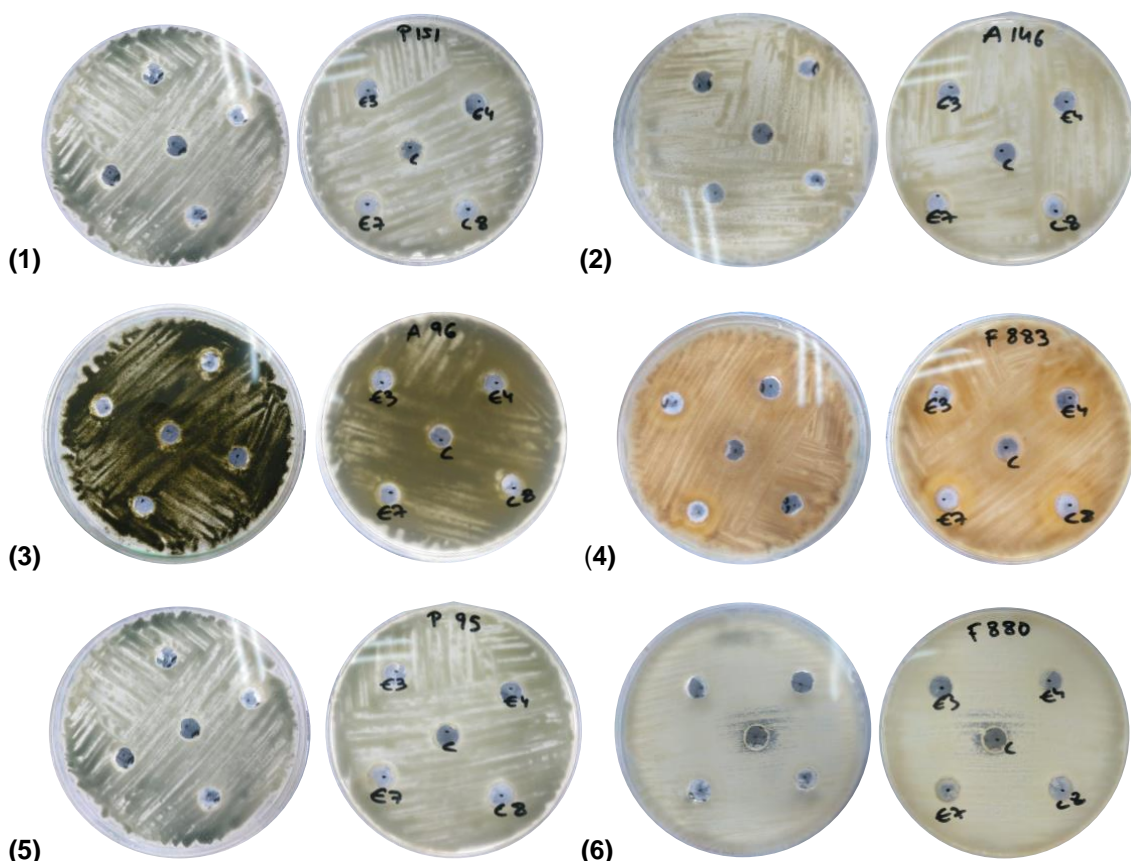


Figura 15. Halos inhibición inóculos bacterias ácido-lácticas en siembras de hongos de los géneros *Aspergillus* (A), *Fusarium* (F) y *Penicillium* (P). En orden de aparición primero placa por parte de delante y luego placa por parte de detrás: (1) hongo P1 P P151, (2) hongo A146, (3) hongo A96, (4) hongo F883, (5) hongo P95 y (6) hongo F880.

Pese a los resultados obtenidos, el estudio realizado por Martí-Quijal y colaboradores en 2020 mostró actividad antifúngica por parte de las bacterias E3 y E4 contra *Aspergillus parasiticus*.

En este sentido, estos autores observaron como los caldos de fermentación de las bacterias E3 y E4 mostraron actividad antifúngica contra *Aspergillus parasiticus*. Asimismo, también obtuvieron en el estudio de Mínima Concentración Inhibitoria (MIC), es decir, la concentración mínima del agente antifúngico para inhibir el crecimiento del hongo comparado con el control, que una concentración de 8 g/L en el caso de la bacteria E3 y 16 g/L para la bacteria E4 es suficiente para actuar contra *Aspergillus parasiticus*.

Asimismo, en otro estudio, realizado por Song y col. (2017), con un mix (*Pseudomonas stutzeri*, *Paenibacillus sp*, *Acidovorax temperans*, *Aspergillus niger*, y *Bacillus subtilis*) y la cabeza, esqueleto, víscera y cola de corvina espinosa, para realizar la fermentación. La mezcla de los subproductos se realizó en agua destilada con glucosa al 3%. Tras la fermentación se realizó el estudio de la actividad antifúngica de los compuestos del caldo de fermentación contra *Pestalotiopsis sp*, *Alternaria cucumerina*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotium rolfsii*.

Estos autores observaron como la concentración más alta (175,80 mg/mL) de los productos de la fermentación obtenidos a partir de los subproductos, mostró un halo de inhibición que demuestra el efecto antifúngico contra *Pestalotiopsis sp*. por parte de los compuestos del caldo de fermentación de subproductos de corvina espinosa fermentados por bacterias ácido-lácticas. Estos resultados reafirman la hipótesis de la actividad antifúngica de los compuestos del caldo de fermentación de subproductos de pescado fermentado por bacterias ácido-lácticas (Song y col., 2017).

Además de los compuestos antifúngicos del caldo de fermentación de las bacterias ácido-lácticas, también se ha propuesto en algunos estudios el aislamiento de los péptidos antifúngicos de estos caldos de fermentación. Sin embargo, esto requiere de técnicas muy sensibles como cromatografía de gases

acoplada a espectrometría de masas o cromatografía líquida de alta resolución. Tras la separación del péptido responsable, se obtiene una concentración superior de este por elución y se procede a su liofilizado. Pese a su aislamiento, la contribución de cada péptido en la inhibición del crecimiento del hongo es difícil de determinar debido a los efectos sinérgicos o aditivos que se da entre los distintos péptidos sintetizados u obtenidos durante la fermentación, lo cual dificulta más el análisis específico de cada péptido. Se requiere ahondar más tanto en el mecanismo de deterioro de los hongos como la acción aislada de los péptidos antifúngicos para mejorar las técnicas de obtención de estos compuestos con carácter antifúngico (Song y col., 2017 y Siedler y col., 2019).

5. Conclusiones

De los resultados obtenidos en el presente estudio es posible concluir que:

1. Los subproductos de pescado, y en concreto de lubina, se muestran como una fuente importante de nutrientes, componentes bioactivos, bacterias ácido-lácticas y compuestos antifúngicos con potencial industrial para el desarrollo de productos y con propiedades beneficiosas para la salud.
2. En concreto, los subproductos de lubina han demostrado ser una buena fuente de proteínas, con un alto contenido en algunos aminoácidos esenciales para los peces como es el caso de la arginina.
3. De igual forma, el porcentaje de lípidos de los subproductos de lubina es muy elevado, conteniendo altos niveles de EPA y DHA, los dos ácidos grasos esenciales para los peces y exclusivos de las materias primas procedentes de productos marinos.
4. La fermentación de subproductos de pescado por bacterias ácido-lácticas presenta un alto potencial para la obtención de compuestos antioxidantes bioactivos y compuestos con carácter antifúngico. Sin embargo, de acuerdo al estudio realizado, sería necesario reformular el caldo de subproductos de lubina con el fin de obtener una mejor fermentación que dé lugar a compuestos con las actividades deseadas.

5. La aplicación del caldo de fermentación de subproductos de pescado como biopreservante natural tiene una alta aplicabilidad en el mercado que deberá ser evaluada reduciendo costes en producción para poder ser un producto de calidad y competitivo en el mercado.
6. La utilización de los subproductos de pescado supondrá una mejora económica, medioambiental y social de la industria acuícola, proporcionando un valor a lo que antes eran descartes.
7. Pese a los avances realizados en investigación, el escalado del laboratorio a la industria es necesario para poder llevar esto al mercado con productos beneficiosos para el consumidor.

Bibliografía

1. Ahmed, N., & Thompson, S. (2019). The blue dimensions of aquaculture: A global synthesis. *Science of The Total Environment*, 652, 851-861.
2. Ahn, C. B., Cho, Y. S., & Je, J. Y. (2015). Purification and anti-inflammatory action of tripeptide from salmon pectoral fin byproduct protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 168, 151-156.
3. Álvarez Trujillo, A. M. (2012). Vida útil de la dorada almacenada en refrigeración con hielo: influencia de distintos factores del cultivo. *Proyecto de investigación: Ph.D. Thesis, Universidad de Murcia, Murcia, España*.
4. Angiolillo, L., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2018). A new method to bio-preserve sea bass fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 271, 60-66.
5. APROMAR (2019). Informe Acuicultura en España. *España*. Obtenido de: <http://apromar.es/sites/default/files/2019/InformeAcui/APROMAR%20Informe%20ACUICULTURA%202019%20v-1-2.pdf>
6. Baki, B., Gönener, S., & Kaya, D. (2015). Comparison of food, amino acid and fatty acid compositions of wild and cultivated sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15, 175-179.
7. Banovic, M., Reinders, M. J., Claret, A., Guerrero, L., & Krystallis, A. (2019). "One Fish, Two Fish, Red Fish, Blue Fish": How ethical beliefs influence consumer perceptions of "blue" aquaculture products? *Food Quality and Preference*, 77, 147-158.
8. Bechtel, P. J. (2007). By-products from seafood processing for aquaculture and animal feeds. In Shahidi, F. (Ed.) *Maximising the Value of Marine By-products* (pp. 435-449). Woodhead Publishing.
9. Caruso, G. (2015). Fishery wastes and by-products: a resource to be valorised. *Journal of Fisheries Sciences*, 9, 80-83.
10. Cortés-Sánchez, A. D. J., Díaz-Ramírez, M., & Salgado-Cruz, M. (2018). Bioconservation, food and fish. *Agroproductividad*, 11, 11-16.
11. Crexi, V. T., Monte, M. L., Soares, L. A., & Pinto, L. A. A. (2010). Production and refinement of oil from carp (*Cyprinus carpio*) viscera. *Food Chemistry*, 119, 945–950.
12. Deán, C. (2016). Nuevas fuentes de proteínas de origen marino. *Trabajo Fin de Grado, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España*.
13. Dutta, M., Majumdar, P. R., Rakeb-UI-Islam, M. D., & Saha, D. (2018). Bacterial and fungal population assessment in smoked fish during storage period. *Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene*, 3, 2476-2059.

14. Estefanell, J., Roo, J., Guirao, R., Afonso, J. M., Fernández-Palacios, H., Izquierdo, M., & Socorro, J. (2012). Efficient utilization of dietary lipids in *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797) fed fresh and agglutinated moist diets based on aquaculture by-products and lowprice trash species. *Aquaculture Research*, *44*, 93-105.
15. EUMOFA (2020). Las noticias destacadas del mes Nº1 / 2020. *Comisión Europea*. Obtenido de : <https://www.eumofa.eu/documents/20178/339391/MH+1+2020+ES.pdf/>
16. FAO (2018). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. *Roma*. Obtenido de: <http://www.fao.org/3/I9540ES/i9540es.pdf>
17. FAO (2019). FAO anuario. Estadísticas de pesca y acuicultura 2017. *Roma*. Obtenido de: <http://www.fao.org/3/ca5495t/CA5495T.pdf>
18. Fang, B., Sun, J., Dong, P., Xue, C., & Mao, X. (2017). Conversion of turbot skin wastes into valuable functional substances with an eco-friendly fermentation technology. *Journal of Cleaner Production*, *156*, 367-377.
19. Feliatra, F., Muchlisin, Z.A., Teruna, H.Y., Utamy, W.R., Nursyirwani, N., & Dahliaty, A. (2018) Potential of bacteriocins produced by probiotic bacteria isolated from tiger shrimp and prawns as antibacterial to *Vibrio*, *Pseudomonas*, and *Aeromonas* species on fish. *F1000Research* *7*, 415.
20. Ferraro, V., Cruz, I. B., Jorge, R. F., Malcata, F. X., Pintado, M. E., & Castro, P. M. (2010). Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review. *Food Research International*, *43*, 2221-2233.
21. Fiori, L., Solana, M., Tosi, P., Manfrini, M., Strim, C., & Guella, G. (2012). Lipid profiles of oil from trout (*Oncorhynchus mykiss*) heads, spines and viscera: trout by-products as a possible source of omega-3 lipids? *Food Chemistry*, *134*, 1088-1095.
22. Gamarro, E. G., Orawattanamateekul, W., Sentina, J., & Gopal, T. S. (2013). By-products of tuna processing. *GLOBEFISH Research Programme FAO*, *112*, 1-48.
23. García-Chavarría, M., & Lara-Flores, M. (2013). The use of carotenoid in aquaculture. *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology*, *8*, 38-49.
24. Garlock, T., Asche, F., Anderson, J., Bjørndal, T., Kumar, G., Lorenzen, K., & Tveterås, R. (2020). A global blue revolution: aquaculture growth across regions, species, and countries. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, *28*, 107-116.

25. Gómez-Sala, B., Herranz, C., Díaz-Freitas, B., Hernández, P. E., Sala, A., & Cintas, L. M. (2016). Strategies to increase the hygienic and economic value of fresh fish: Biopreservation using lactic acid bacteria of marine origin. *International Journal of Food Microbiology*, 223, 41-49.
26. González, M. I. C. (2002). Ácidos grasos omega 3: beneficios y fuentes. *Interciencia*, 27, 128-136.
27. Haq, M., Ahmed, R., Cho, Y. J., & Chun, B. S. (2017). Quality properties and bio-potentiality of edible oils from Atlantic salmon by-products extracted by supercritical carbon dioxide and conventional methods. *Waste and Biomass Valorization*, 8, 1953-1967.
28. Haq, M., Park, S. K., Kim, M. J., Cho, Y. J., & Chun, B. S. (2018). Modifications of Atlantic salmon by-product oil for obtaining different ω -3 polyunsaturated fatty acids concentrates: An approach to comparative analysis. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 545-556.
29. Honold, P. J., Nouard, M. L., & Jacobsen, C. (2016). Fish oil extracted from fish-fillet by-products is weakly linked to the extraction temperatures but strongly linked to the omega-3 content of the raw material. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118, 874-884.
30. Honold, P. J., Nouard, M. L., & Jacobsen, C. (2016). Oxidative stability during storage of fish oil from filleting by-products of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is largely independent of the processing and production temperature. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118, 967-973.
31. Ido, A., & Kaneta, M. (2020). Fish Oil and Fish Meal Production from Urban Fisheries Biomass in Japan. *Sustainability*, 12, 3345.
32. Iñarra, B., Bald, C., Martín, D. S., Orive, M., Cebrián, M., & Zufía, J. (2018). Guía para la valorización de subproductos de la acuicultura. AZTI, Derio, España. Obtenido de: https://www.azti.es/wp-content/uploads/2018/12/AZTI_guia_VALACUI101218online.pdf
33. Irianto, H. E., & Dewi, A. S. (2014). Prospective utilization of fishery by-products in Indonesia. In Kim S. (Ed.) *Seafood Processing By-Products* (pp. 21-34). Springer, New York, NY.
34. Jackson, A. & Newton, R.W. (2016). Project to model the use of fisheries byproduct in the production of marine ingredients, with special reference to the omega 3 fatty acids EPA and DHA. *Institute of Aquaculture, University of Stirling, UK and IFFO, The Marine Ingredients Organisation*. Obtenido de: <https://www.iffco.com/byproduct>
35. Jacobsen, C., & Marinho, G. S. (2018). Different raw material for fishmeal and fish oil production-Sources, regulations, quality criteria, and research needs.

Nordic Centre of Excellence Network in Fishmeal and Fish Oil. Obtenido de: https://effop.org/wp-content/uploads/2019/01/presentation-1_-raw-material-for-fishmeal-and-fish-oil-production_dtu_food.pdf

36. Jini, R., Swapna, HC., Rai, A. K., Vrinda, R., Halami, PM., Sachindra, NM., & Bhaskar, N. (2011). Isolation and characterization of potential lactic acid bacteria (LAB) from freshwater fish processing wastes for application in fermentative utilisation of fish processing waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1516-1525.
37. Kalhor, H., Zhou, J., Hua, Y., Ng, W. K., Ye, L., Zhang, J., & Shao, Q. (2018). Soy protein concentrate as a substitute for fish meal in diets for juvenile *Acanthopagrus schlegelii*: Effects on growth, phosphorus discharge and digestive enzyme activity. *Aquaculture Research*, 49, 1896-1906.
38. Kasankala, L. M., Xiong, Y. L., & Chen, J. (2012). Enzymatic activity and flavor compound production in fermented silver carp fish paste inoculated with douchi starter culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 226-233.
39. Kim, S. K., & Venkatesan, J. (2014). Introduction to seafood processing by-products. In Kim S. (Ed.) *Seafood Processing By-Products* (pp. 1-9). Springer, New York, NY.
40. Kok, B., Malcorps, W., Tlusty, M. F., Eltholth, M. M., Auchterlonie, N. A., Little, D. C., & Davies, S. J. (2020). Fish as feed: Using economic allocation to quantify the Fish in-Fish-out ratio of major fed aquaculture species. *Aquaculture*, 528, 735474.
41. Lanes, O., Guddal, P. H., Gjellesvik, D. R., & Willassen, N. P. (2000). Purification and characterization of a cold-adapted uracil-DNA glycosylase from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 127, 399-410.
42. Leal, Y., Reyes, M., Álvarez, J. D., Obregón, J., & Viña, X. (2009). Enteropatógenicidad de bacterias aisladas de peces, del agua y plancton de su entorno en Venezuela. *Revista Científica*, 19, 446-454.
43. Létisse, M., Rozières, M., Hiol, A., Sergent, M., & Comeau, L. (2006). Enrichment of EPA and DHA from sardine by supercritical fluid extraction without organic modifier I. Optimization of extraction conditions. *Journal of Supercritical Fluids*, 38, 27–36.
44. Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., & Coton, E. (2017). Antifungal microbial agents for food biopreservation—a review. *Microorganisms*, 5, 37.
45. Liu, H. J., Chang, B. Y., Yan, H., W., Yu, F. H., & Lu, X. (1995). Determination of 6 amino acids in food and feed by derivatization with 6-aminoquinoly-N-

- 7-hydroxysuccinimidyl carbamate and reverse-phase liquid chromatographic separation. *Journal of AOAC International* 78, 736-744
46. López-Pedrouso, M., Lorenzo, J. M., Cantalapiedra, J., Zapata, C., Franco, J. M., & Franco, D. (2020). Aquaculture and by-products: Challenges and opportunities in the use of alternative protein sources and bioactive compounds. In Lorenzo, J.M. & Barba, F.J. (Ed.) *Advances in Food and Nutrition Research* (pp. 127-185). Academic Press.
 47. Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Gomez, B., Barba, F. J., Mora, L., Perez-Santaescolastica, C., & Toldra, F. (2018). Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review. *Trends in food science & technology*, 79, 136-147.
 48. Martí-Quijal, F. J., Remize, F., Meca, G., Ferrer, E., Ruiz, M. J., & Barba, F. J. (2020). Fermentation in fish and by-products processing: An overview of current research and future prospects. *Current Opinion in Food Science*, 31, 9-16.
 49. Martí-Quijal, F. J., Tornos, A., Príncipe, A., Luz, C., Meca, G., Tedeschi, P., Ruíz, M.J., & Barba, F. J. (2020). Impact of fermentation on the recovery of antioxidant bioactive compounds from sea bass byproducts. *Antioxidants*, 9, 239.
 50. Martí-Quijal, F. J., Príncipe, A., Tornos, A., Luz, C., Meca, G., Tedeschi, P., Ruíz, M.J., Barba, F. J., & Mañes, J. (2020). Isolation, Identification and Investigation of Fermentative Bacteria from Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*): Evaluation of Antifungal Activity of Fermented Fish Meat and By-Products Broths. *Foods*, 9, 576.
 51. Matos, E., Silva, T. S., Colen, R., Dinis, M. T., & Dias, J. (2014). Plant protein and vegetable oil-based diets modulate gilthead seabream (*Sparus aurata*) muscle biochemical status and proteolytic enzymes at an early postmortem stage. *Aquaculture Nutrition*, 20, 153-162.
 52. Mathur, H., Beresford, T. P., & Cotter, P. D. (2020). Health Benefits of Lactic Acid Bacteria (LAB) Fermentates. *Nutrients*, 12, 1679.
 53. Ministerio de Medio Ambiente (Gobierno de España) (2012). El aprovechamiento de los subproductos de pescado para la obtención de productos finales y bioactivos. *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente Secretaría General Técnica - Centro de Publicaciones. Madrid*
 54. Munekata, P. E., Pateiro, M., Domínguez, R., Zhou, J., Barba, F. J., & Lorenzo, J. M. (2020). Nutritional characterization of sea bass processing by-products. *Biomolecules*, 10, 232.
 55. Nahuelhual, L., Defeo, O., Vergara, X., Blanco, G., Marín, S. L., & Bozzeda, F. (2019). Is there a blue transition underway?. *Fish and Fisheries*, 20, 584-595.

56. Naylor, R. L., Goldberg, R. J., Primavera, J. H., Kautsky, N., Beveridge, M. C., Clay, J., & Troell, M. (2000). Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, *405*, 1017-1024.
57. Nawaz, A., Li, E., Irshad, S., Xiong, Z., Xiong, H., Shahbaz, H. M., & Siddique, F. (2020). Valorization of fisheries by-products: Challenges and technical concerns to food industry. *Trends in Food Science & Technology*, *99*, 34-43.
58. Nguyen, E., Jones, O., Kim, Y. H. B., San Martin-Gonzalez, F., & Liceaga, A. M. (2017). Impact of microwave-assisted enzymatic hydrolysis on functional and antioxidant properties of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by-products. *Fisheries Science*, *83*, 317-331.
59. Nikoo, M., Benjakul, S., Yasemi, M., Gavlighi, H. A., & Xu, X. (2019). Hydrolysates from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing by-product with different pretreatments: Antioxidant activity and their effect on lipid and protein oxidation of raw fish emulsion. *LWT - Food Science and Technology*, *108*, 120-128.
60. OESA - Fundación Biodiversidad (2017). Guía de Minimización de Subproductos y residuos de la acuicultura. *Fundación Biodiversidad*, Madrid, España. Obtenido de: https://www.observatorio-acuicultura.es/sites/default/files/images/adjuntos/libros/guia_minimizacion_residuos_acuicultura_web.pdf
61. O'Fallon, J. V., Busboom, J. R., Nelson, M. L., & Gaskins, C. T. (2007). A Direct Method for Fatty Acid Methyl Ester Synthesis: Application to Wet Meat Tissues, Oils, and Feedstuffs. *Journal of Animal Science*, *85*, 1511-1521.
62. Olsen, R. L., Johansen, A., & Myrnes, B. (1990). Recovery of enzymes from shrimp waste. *Process Biochemistry*, *25*, 67-68.
63. Olsen, R. L., Toppe, J., & Karunasagar, I. (2014). Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. *Trends in Food Science & Technology*, *36*, 144-151.
64. Özcelik, S., Kuley, E., & Özogul, F. (2016). Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT- Food Science and Technology*, *73*, 536-542.
65. Özyurt, G., Özkütük, A. S., Uçar, Y., Durmuş, M., & Özoğul, Y. (2018). Fatty acid composition and oxidative stability of oils recovered from acid silage and bacterial fermentation of fish (Sea bass–*Dicentrarchus labrax*) by-products. *International Journal of Food Science & Technology*, *53*, 1255-1261.
66. Parlamento Europeo (2008). DIRECTIVA 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 19 de noviembre de 2008 sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas.

67. Perera, U. M. S. P. & Rajapakse, N. (2016). Chitosan Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Applications. In Kim S. (Ed.) *Seafood Processing By-Products* (pp. 371-388). Springer-Verlag New York.
68. Rai, A. K., Jini, R., Swapna, H. C., Sachindra, N. M., Bhaskar, N., & Baskaran, V. (2011). Application of native lactic acid bacteria (LAB) for fermentative recovery of lipids and proteins from fish processing wastes: Bioactivities of fermentation products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 20, 32-44.
69. Ramírez, A. (2013). Innovative uses of fisheries by-products. *GLOBEFISH Research Programme*, 110, 1-53.
70. Ramírez-Navas, J. S. (2006). Liofilización de alimentos. *Revista Revisiones de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos*, 6, 1-40.
71. Rinto, Nopianti, R., Herpandi, & Oktaviani, S. (2017). Fractionation of Anticholesterol Bioactive Compounds from Bekasam (Indonesian Fermented Fish Product). *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 40, 399–406.
72. Rustad, T. (2007). Physical and chemical properties of protein seafood by-products. In Shahidi, F. (Ed.) *Maximising the value of marine by-products* (pp. 3-21). Woodhead Publishing.
73. Sadiq, F. A., Yan, B., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2019). Lactic Acid Bacteria as Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Agents: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, 1403-1436.
74. Sahena, F., Zaidul, I. S. M., Jinap, S., Yazid, A. M., Khatib, A., & Norulaini, N. A. N. (2010). Fatty acid compositions of fish oil extracted from different parts of Indian mackerel (*Rastelliger kanagurta*) using various techniques of supercritical CO₂ extraction. *Food Chemistry*, 120, 879–885.
75. Shahidi, F. (2006). Maximising the value of marine by-products: an overview. In Shahidi, F. (Ed.) *Maximising the value of marine by-products* (pp. xxi-xxiv). Woodhead Publishing.
76. Shi, S., Li, J., Guan, W., & Blersch, D. (2018). Nutrient value of fish manure waste on lactic acid fermentation by *Lactobacillus pentosus*. *RSC advances*, 8, 31267-31274.
77. Siedler, S., Balti, R., & Neves, A. R. (2019). Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 138-146.
78. Sila, A., Ghilissi, Z., Kamoun, Z., Makni, M., Nasri, M., Bougatef, A., & Sahnoun, Z. (2015). Astaxanthin from shrimp by-products ameliorates nephropathy in diabetic rats. *European Journal of Nutrition*, 54, 301-307.

79. Song, R., Shi, Q. Q., Gninguue, A., Wei, R. B., & Luo, H. Y. (2017). Purification and identification of a novel peptide derived from by-products fermentation of spiny head croaker (*Collichthys lucidus*) with antifungal effects on phytopathogens. *Process Biochemistry*, 62, 184-192.
80. Sorroza, L. (2012). Propuesta de nuevas cepas probióticas para su uso en acuicultura. *Proyecto de investigación: Ph.D Thesis, Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Palmas de Gran Canaria, España.*
81. Sousa, M. A. D., Rama, G. R., Volken de Souza, C. F., & Granada, C. E. (2020). Acid lactic lactobacilli as a biotechnological toll to improve food quality and human health. *Biotechnology Progress*, 36, e2937.
82. Stabili, L., Cecere, E., Licciano, M., Petrocelli, A., Sicuro, B., & Giangrande, A. (2019). Integrated Multitrophic Aquaculture By-Products with Added Value: The Polychaete *Sabella spallanzanii* and the Seaweed *Chaetomorpha linum* as Potential Dietary Ingredients. *Marine Drugs*, 17, 677.
83. Stevens, J. R., Newton, R. W., Tlusty, M., & Little, D. C. (2018). The rise of aquaculture by-products: Increasing food production, value, and sustainability through strategic utilisation. *Marine Policy*, 90, 115-124.
84. Sun, T., Pigott, G. M., & Herwig, R. P. (2002). Lipase-assisted concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids from viscera of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). *Journal of Food Science*, 67, 130–136.
85. Sun, J., Yu, X., Fang, B., Ma, L., Xue, C., Zhang, Z., & Mao, X. (2016). Effect of fermentation by *Aspergillus oryzae* on the biochemical and sensory properties of anchovy (*Engraulis japonicus*) fish sauce. *International Journal of Food Science & Technology*, 51, 133-141.
86. Thammapat, P., Raviyan, P., & Siriamornpun, S. (2010). Proximate and fatty acids composition of the muscles and viscera of Asian catfish (*Pangasius bocourti*). *Food Chemistry*, 122, 223–227.
87. Tirloni, E. (2014). Improvement of food safety and microbial interactions. *Proyecto de Investigación: Ph.D Thesis, Università degli Studi di Milano, Milán, Italia.*
88. Vallejo, M., Olivera, N. L., Sequeiros, C., & Marguet, E. R. (2009). Actividad antilisteria de bacterias ácido-lácticas aisladas de peces marinos. *Analecta Veterinaria* 29, 19-23
89. Vázquez, J. A., Sotelo, C. G., Sanz, N., Pérez-Martín, R. I., Rodríguez-Amado, I., & Valcarcel, J. (2019). Valorization of Aquaculture By-Products of Salmonids to Produce Enzymatic Hydrolysates: Process Optimization, Chemical Characterization and Evaluation of Bioactives. *Marine Drugs*, 17, 676.

90. Veras, F. F., Correa, A. P. F., Welke, J. E., & Brandelli, A. (2016). Inhibition of mycotoxin-producing fungi by *Bacillus* strains isolated from fish intestines. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 23-32.
91. Xu, Y., Zang, J., Regenstein, J. M., & Xia, W. (2020). Technological roles of microorganisms in fish fermentation: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15, 1-13.
92. Zang, J., Xu, Y., Xia, W., & Regenstein, J. M. (2020). Quality, functionality, and microbiology of fermented fish: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60, 1228-1242.
93. Zapata, J. I. H., & Castañeda, C. A. G. (2017). Hidrolizados de pescado—producción, beneficios y nuevos avances en la industria. - Una revisión. *Acta Agronómica*, 66, 311-322.
94. Zaragozá, P., Martínez-Llorens, S., Fernández-Segovia, I., Vivancos, J. L., Tomas-Vidal, A., Fuentes, A., ... & Barat, J. M. (2020). Study of Fishmeal Substitution on Growth Performance and Shelf-Life of Giltheadsea Bream (*Sparus aurata*). *Fishes*, 5, 15.
95. Zhao, J., Jiang, Q., Xu, Y., & Xia, W. (2017). Effect of mixed kojis on physiochemical and sensory properties of rapid-fermented fish sauce made with freshwater fish by-products. *International Journal of Food Science & Technology*, 52, 2088-2096.
96. Zhong, Y., Madhujith, T., Mahfouz, N., & Shahidi, F. (2007). Compositional characteristics of muscle and visceral oil from steelhead trout and their oxidative stability. *Food Chemistry*, 104, 602–608.
97. Zhou, X. (2018). Notes from the aquaculture statistician. *FAO Aquaculture Newsletter*, 58, 6-8.