

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.

Generación de Efluentes con Baja Carga Contaminante y Caracterización de Sólidos Derivados del Agua de Cola Tratada por Centrifugación y Ajuste de pH

Por

CELIA OLIVIA GARCÍA SIFUENTES

TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

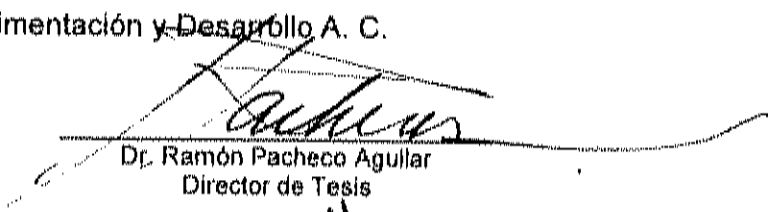
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

DICIEMBRE DEL 2007

CARTA DE APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la M. en C. Celia Olivia García Sifuentes, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias, dentro del Programa de Doctorado en Ciencias del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.

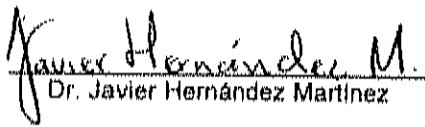


Dr. Ramón Pacheco Agullar
Director de Tesis



Dr. Gastón Torrescano Urrutia

Dr. Francisco M. Goycoolea Valencia

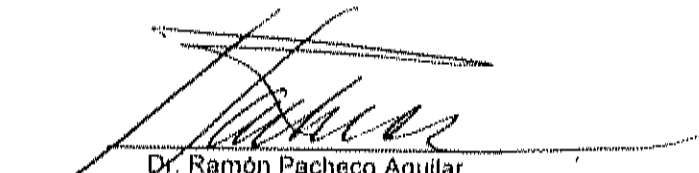


Dr. Javier Hernández Martínez

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

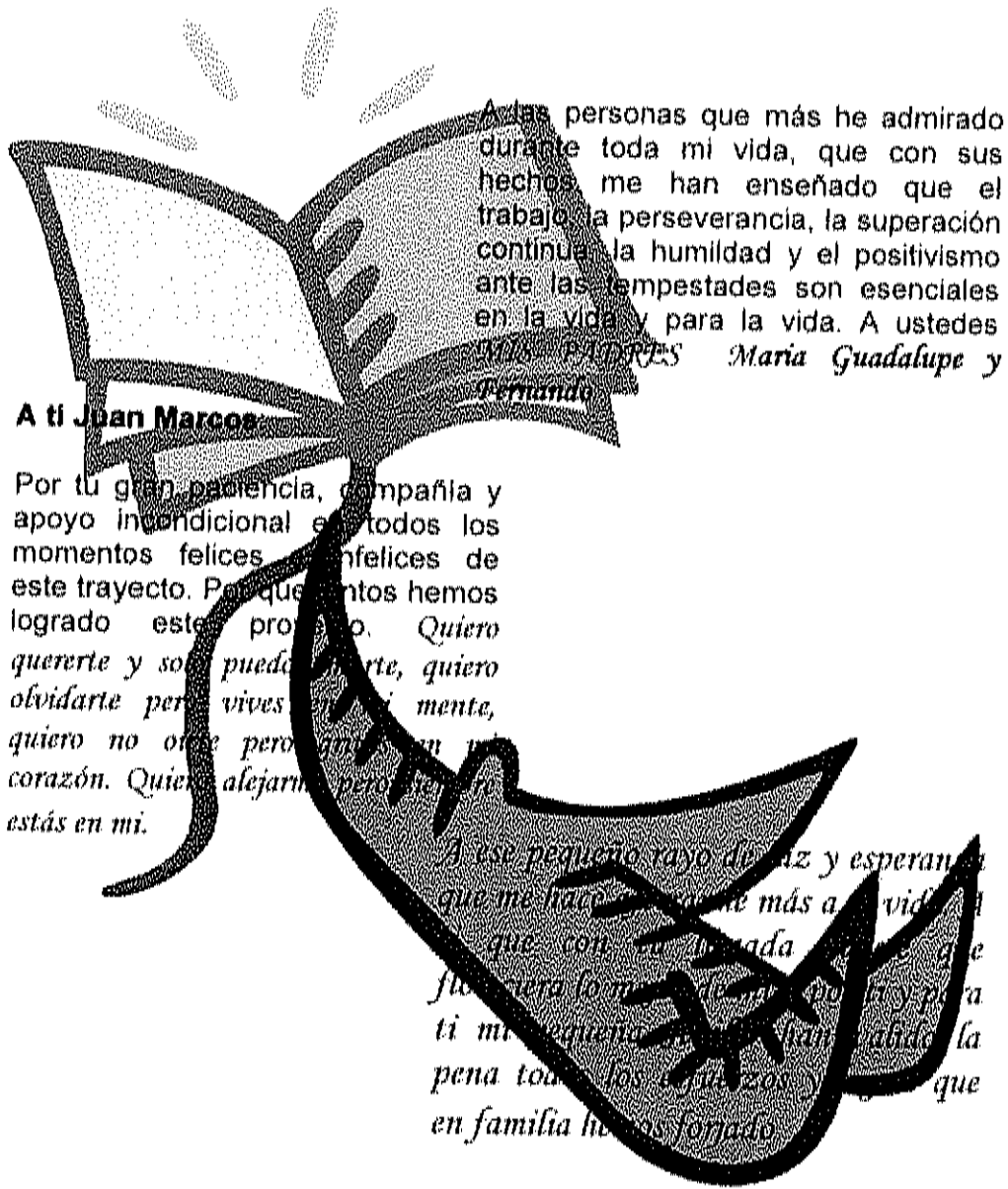
Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando de el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD,A.C.).

La publicación de comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, A.C previa autorización escrita del manuscrito en cuestión, del Director o Directora de tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General
C.I.A.D.,A.C.

DEDICATORIAS



A las personas que más he admirado durante toda mi vida, que con sus hechos me han enseñado que el trabajo, la perseverancia, la superación continua, la humildad y el positivismo ante las tempestades son esenciales en la vida y para la vida. A ustedes **MIS PADRES** *Maria Guadalupe y Fernando*

A ti Juan Marcos:

Por tu gran paciencia, compañía y apoyo incondicional en todos los momentos felices e infelices de este trayecto. Por que juntos hemos logrado este propósito. Quiero quererte y solo puedo quererte, quiero olvidarte pero vives en mi mente, quiero no oírte pero estás en mi corazón. Quiero alejarme pero siempre estás en mi.

A ese pequeño rayo de luz y esperanza que me iluminó y me hizo más aviduo, que con tu mirada me enseñó que fuera lo mejor de mí, que para ti mi existencia siempre estuvo habiendo la pena todos los días, que en familia hemos formado

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** por brindarme salud, paciencia y sabiduría durante todos los momentos de este y otros trayectos.

A **CONACYT** por todo el apoyo brindado durante este proceso de preparación, sin el apoyo económico brindado durante estos años no estaría donde estoy ahora.

A mi querido y distinguido **director de tesis Dr. Ramón Pacheco Agullar**, por compartir todo su valioso tiempo, sabiduría y experiencia. MUCHAS GRACIAS

A mi Comité de Tesis. Por el apoyo, aportaciones y sugerencias que realizaron durante esta etapa de preparación.

A los miembros del comité de tesis GRACIAS por su valiosa e invaluable participación durante la fase del desarrollo de nuestra investigación. Dr. Francisco Gooycolea, Dr. Gastón Torrescano, Dr. Javier Hernández.

A **las chicas superpoderosas** que con sus aportaciones tan acertadas dieron riqueza al trabajo y a la colaboración en equipo. GRACIAS SUPERMAESTRAS, M.C. Gisela Carvallo R., M.C. Ma. Elena Lugo y M.C. Guillermina García S.

Al Laboratorio de la **Dra. Ana M. Calderón** por facilitarme el uso de algunos de sus equipos, en especial al **Q.B. René Valenzuela** por su valiosa disposición.

Al Q.B. **Francisco Vazquez Ortiz** por su cooperación y disposición para en asesorías no programadas.

Al laboratorio de análisis Proximal, por las facilidades proporcionadas para el uso de algunos equipos. En especial a la **Q.B. Erika Javier** por su cooperación.

A los distinguidos miembros del laboratorio de polímeros por el apoyo clave brindado durante el arranque de las actividades del proyecto. **Leticia Félix, Karla Martínez, Alma Campa** GRACIAS por la balanza, el liofilizador y demás.

Al Dr. Miguel Angel Valdez por su apoyo y disposición en el uso de equipos en su laboratorio en la Universidad de Sonora.

A Todos mis amigos y compañeros del Laboratorio. Juan Antonio, Enrique, Hilda, Willy, GRACIAS POR SUS APORTACIONES.

A los doctores miembros del equipo de pesqueros muchas gracias por su colaboración y ayuda durante los seminarios de preparación y asesorías directas. **Dr. Juan Carlos Ramírez y Dra. Teresa Goyas**

Al personal de soporte técnico en especial a **Ana Aurora Vidal Martínez** por su disposición continua y repetitiva en el mantenimiento necesario de los equipos de cómputo.

A Antonio Orozco y Jorge Mercado por su disposición y apoyo siempre presente.

A todos aquellos que de momento no están presentes en mi pequeña mente
MUCHAS GRACIAS.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	x
I.- RESUMEN.....	xi
II.- INTRODUCCIÓN.....	1
III.- HIPOTESIS.....	3
IV.- OBJETIVOS.....	4
V.- REVISION DE LITERATURA.....	5
Impacto ambiental de los efluentes de la industria pesquera.....	5
Importancia del Agua de Cola (AC).....	7
Procesos de recuperación de sólidos de AC.....	9
Evaporación.....	9
Precipitación fisicoquímica.....	11
Sistemas a base de membranas.....	14
Sistemas por flotación.....	16
Potencial de los subproductos de la industria pesquera como ingredientes funcionales y suplementos nutricionales.....	17
VI.- MATERIALES Y METODOS.....	22
Materia prima.....	22
Estrategia Experimental.....	22
Tratamientos.....	23
Estudios preliminares.....	23
Tratamientos Experimentales.....	23
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO ₈).....	28
Demanda química de oxígeno (DQO).....	28

Transmitancia.....	28
pH.....	28
Radio hidrodinámico (R _H).....	29
Composición proximal.....	29
Perfil de aminoácidos.....	30
Contenido de aminoácidos libres.....	31
Contenido de colágeno.....	31
Contenido de minerales.....	32
Medición del color.....	32
Estabilidad al índice de blancura.....	32
Perfil electroforético.....	33
Digestibilidad in Vitro.....	33
Solubilidad del nitrógeno.....	34
Capacidad de emulsificación (CE).....	34
Estabilidad de la emulsión (EE).....	35
Diseño experimental y análisis estadístico.....	35
VII.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
"The effect of a complementary centrifugation and pH shift treatment applied to stickwater from fishmeal plant on the compositional characteristic of final effluent"	40
"Compositional and physicochemical characterization of a final effluent derived from a novel multiple stages treatment of fishmeal stick-water"	65
"Properties of recovered solids from stickwater treated by centrifugation and pH shift"	83
VIII.- CONCLUSIONES FINALES.....	125
IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

LISTA DE FIGURAS

Figura No.	Título	Página
1	Diagrama de Flujo de los estudios preliminares.....	25
2	Diagrama de Flujo del primer tratamiento experimental...	26
3	Diagrama de Flujo del segundo tratamiento experimental	27

I.- RESUMEN

La industria reductora de especies marinas, genera contaminación y desperdicio de proteínas potencialmente útiles; para evitarlo, se usan métodos de evaporación y ultrafiltración (UF). El presente trabajo tuvo como finalidad presentar una alternativa al tratamiento de agua de cola (AC) y contribuir en la reducción del impacto ambiental producida por este tipo de efluentes y al mismo tiempo evaluar la potencialidad química, nutricional y funcional de las proteínas recuperadas, aplicando centrifugación complementaria y modificación del pH. Se trató AC por centrifugación complementaria, seguida de ajuste de pH y ultrafiltración. Se realizaron varios experimentos para seleccionar agentes alcalinos y ácidos para producir los cambios de pH en el ACC a tratar. El tratamiento alcalino por si mismo no fue satisfactorio para la reducción de la demanda bioquímica y química de oxígeno (DBO₅, DQO). Sin embargo la combinación del tratamiento en condiciones alcalinas con el ácido seguido de una centrifugación resultó en la recuperación del 60% de los compuestos nitrogenados presentes (proteínas, péptidos y aminoácidos). El efluente final bajo estas condiciones mostró transmitancias del 70% y reducciones del 85% en DBO₅ y DQO. No obstante estas características el efluente final resultó con un pH de 1.5, factor limitante para la eliminación del efluente generado. Las características del efluente final derivado de un tratamiento de múltiples etapas (centrifugación-ajuste de pH-ultrafiltración), mostraron que antes de la UF, con el tratamiento TCA-NaOH se removieron 81±22% y 66±12% de DBO₅ y DQO respectivamente, mientras que con HCl-NaOH 81.0±20% y 66.0±12%. La UF (1 kDa) en el tratamiento con TCA resultó en un 99% y 90.2% de remoción para DBO₅ y DQO, respectivamente. Se recuperaron fracciones sólidas (HCl FI₁, FI₂ y TCA FI₁, FI₂) de ambos tratamientos; las cuales se evaluaron química, nutricional y funcionalmente. Los mejores resultados se encontraron utilizando el TCA en el tratamiento. Las fracciones TCA FI₁ y FI₂ presentaron una composición de 76.0±4% y 16.9±3.1 de proteína, 12.0±6.2% y 2.9±1.9% de grasa, 7.9±2% y 75.4±2.6 de cenizas respectivamente. TCA FI₂ y FI₁ resultaron ser buenas fuentes de Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, P⁻³, K⁺ y aminoácidos esenciales. Adicionalmente presentaron digestibilidad in vitro mayor al 85% y capacidades de emulsificación comparables con los controles utilizados. Los resultados de

este estudio sugieren que el tratamiento propuesto puede ser una alternativa tecnológica factible para el tratamiento del AC y al mismo tiempo los sólidos recuperados podrían tener potencial para poder ser utilizados como ingredientes alimentarios.

II.- INTRODUCCIÓN

En diversas partes del mundo (Perú, Chile, Ecuador, España, etc.) se encuentran en operación plantas productoras de harina de pescado. El proceso de fabricación sigue las mismas operaciones, donde se captura al pescado fresco y se convierte en harina para múltiples propósitos (ej. Alimentación acuícola, animales terrestres y nutrición humana). Las especies que normalmente se capturan con esta finalidad son la sardina (*Sardinops sagax caerulea*), Macarela (*Scomber japonicus*), anchoveta (*Engraulis mordax*, *Cetengraulis mysticetus*,) y arenque (*Clupea pallasii pallasii*) (Goycoolea y col., 1997; Guerrero y col., 1998). La pesca en Sonora representa aproximadamente el 61 % de la captura nacional de sardina. Del total de capturas (387,530 ton), el 73% fue representado por sardina, macarela y anchoveta principalmente; de los cuales 216,566 ton se destinaron a la industria harinera (Conapesca, 2005).

La elaboración de harina de pescado demanda grandes volúmenes de agua durante el proceso, generando a la vez grandes cantidades de subproductos como agua de cola (AC) y aceite de pescado. El AC contiene una gran cantidad de materia orgánica y, en la mayoría de los casos, esta se descarga directamente al mar (Irlanda-Francis, 2002; López-Ríos y Lechuga-Anaya, 2001; Miller y col., 2001; Roeckel y col., 1996; Wu y col., 2002).

En una planta procesadora, el método más común de producción de harina y aceite de pescado básicamente consiste en el cocinado a vapor, prensado y secado. El licor obtenido durante el prensado pasa a través de un decanter para eliminar sólidos y posteriormente se somete a un proceso de centrifugación, de donde se obtiene aceite de pescado sin refinar y AC entera. (Green y col., 1976). El AC es una emulsión de aceite en agua, en la cual el aceite es acompañado por proteínas y otros materiales orgánicos. La composición del AC puede variar dependiendo de la especie de pescado, época de captura, estado fisiológico, condiciones de almacenamiento del mismo y del manejo operacional de la planta harinera (Castillo y col., 1987;

Del Valle y Aguilera, 1990; Del Valle y Aguilera, 1991; Goycoolea y col., 1997; Guerrero y col., 1998)).

El alto contenido de proteínas y sólidos suspendidos añade un especial interés en la implementación de técnicas de recuperación de sólidos con el fin de optimizar el proceso de producción a un bajo costo; además de reducir la posibilidad de contaminación de las bahías.

Por medio de la sedimentación y centrifugación puede removerse una fracción de material proteico y aceite. En algunas industrias se ha implementado el proceso de evaporación al vacío del AC, del cual se recupera una fracción llamada solubles de pescado. Sin embargo, el proceso no es del todo eficiente debido a la composición del AC, por lo que se requiere de un tratamiento previo, ya sea químico o biológico para poder modificar de alguna manera el material soluble, grasa emulsificada y partículas coloidales que no pueden recuperarse por medio de centrifugación y sedimentación (Civit y col., 1982; Del Valle y Aguilera, 1990; Prakash y Sengupta, 2003).

Se han propuesto numerosos métodos para la recuperación de proteínas simultáneamente con el tratamiento del AC. Entre ellos se menciona la modificación del pH combinado con el calor (Civit y col., 1982); combinación del pH con coagulantes (Castillo y col., 1987; Guerrero y col., 1998) y combinación de pH con quitosano (Afonso y Borquez, 2002).

Indudablemente los cambios de pH modifican la solubilidad de las proteínas. No obstante, es indispensable la optimización minuciosa del pH para poder recuperar gran parte de ellas. Estudios preliminares realizados a la fecha en el Laboratorio de Productos Pesqueros de la Dirección de Tecnología de Alimentos de Origen Animal (DTAOA) en CIAD A.C. Hermosillo, indican que las proteínas en solución/suspensión del AC modifican su comportamiento como respuesta a los cambios de pH. Por lo que el presente estudio contempló el tratamiento de AC a diferentes pH, modificando con ello el comportamiento del contenido proteico en la misma, promoviendo su precipitación y con ello una eficiente separación por medios físicos (centrifugación y ultrafiltración).

III.- HIPOTESIS

La acción combinada de centrifugación y modificación de pH en agua de cola (AC), promoverá la recuperación de sólidos con propiedades funcionales y generará efluentes que cumplan con los niveles de pH, DBO₅ y DQO dictados por la NTE-CCA-02B/90.

IV.- OBJETIVOS

Objetivo General

Generar efluentes que cumplan con los niveles de pH, DBO₅ y DQO dictados por la Norma Técnica (NTE-CCA-028/90) y evaluar química, nutricional y funcionalmente los sólidos recuperados del AC tratada por centrifugación y modificación de pH.

Objetivos Específicos

Seleccionar a los agentes alcalinos y ácidos para generar los cambios de pH en el AC.

Determinar el pH óptimo de recuperación de sólidos y agregación de las proteínas en AC centrifugada (ACC) que ayuden en la generación de efluentes que cumplan con la norma NTE-CCA-028/90.

Caracterizar química, nutricional y funcionalmente los sólidos recuperados y el efluente generado producto del tratamiento.

Caracterizar el efluente final generado por la industria y compararlo con la composición del efluente final obtenido en el laboratorio.

V.- ANTECEDENTES

Impacto ambiental de los efluentes de la industria reductora

La problemática ambiental perturba o afecta a todas las comunidades humanas. Uno de los problemas ambientales más serios y perjudiciales es la contaminación. Esta puede ser en el agua, suelo, aire y en efectos en la salud del ser humano. Se considera que si se llegan a afectar los tres primeros, los seres vivos que ahí habitan se verán directamente perjudicados y, aunque solo se viertan contaminantes en alguno de ellos, se puede dañar los demás por interdependencia (Mérida y col., 1997). El principal impacto de los efluentes de la industria pesquera es la contaminación, debido a que gran parte de los efluentes líquidos son de naturaleza orgánica y en algunos casos son vertidos directamente al mar. El impacto ambiental causado por estos efluentes dependerá de su naturaleza física, composición química, volumen eliminado y temperatura a la que son vertidos al ambiente. La composición de los efluentes líquidos de la industria es altamente variable. Esta depende principalmente de las condiciones higiénicas sanitarias y de las condiciones de operación de la planta (Fernández y col., 2003)

Los principales efluentes líquidos provenientes de la industria reductora son: el agua de succión o de bombeo, que se refiere al agua que transporta los pescados desde el puerto hacia la planta; la sanguaza, que es originada por la liberación de agua con sangre producto de la presión del pescado entero durante su almacenamiento en grandes volúmenes; y

finalmente, el AC que es la fase residual acuosa proveniente de la centrifugación del licor de prensa previamente decantado (Ahumada y col., 2004; Cabrera, 1999; Del Valle y Aguilera, 1990; Fernández y col., 2003; Kameya, 2005; López y Lechuga, 2001; Majluf y col., 2007). La importancia en el ambiente de estos efluentes líquidos es que pueden causar desequilibrio en las propiedades físicas, químicas y biológicas en el sedimento y agua de mar. Estas propiedades se ven afectadas por cambios en la salinidad, disminución de oxígeno disuelto, aumento de la DBO₅, incremento de nutrientes (P,N), alta carga de sulfuros y amonio en sedimentos e incremento de la temperatura, lo cual pueden llevar a un proceso de eutrofización (Cabrera, 1999; 2001)

El impacto en el paisaje marino se manifiesta con la presencia de residuos de aceites y grasas, y sólidos en suspensión, dando mala apariencia. En lo referente al impacto en el hombre, éste se manifiesta por la aparición de enfermedades del sistema respiratorio y digestivo, así como enfermedades alérgicas, infecciosas y parasitarias y, aunque estos eventos podrían estar asociados a actividades industriales pesqueras, aún no hay estudios epidemiológicos que lo confirmen. No obstante lo anterior, se ha reportado un incremento en las patologías antes mencionadas cuando las fábricas pesqueras entran en actividad (Cabrera, 2001; Majluf y col., 2007).

Con respecto a la problemática generada por efluentes como el AC, en México existen regulaciones nacionales que controlan el desecho de este tipo de contaminantes emitiendo normas técnicas o en su caso normas oficiales, como es el caso de la Norma Técnica NTE-CCA-028/90 que

establece los límites máximos permisibles de los parámetros de los contaminantes, para las descargas de aguas residuales provenientes de la industria de la preparación y envasado de conservas de pescados y mariscos y de la industria de producción de harina de pescado en cuerpos receptores. Dicha norma es considerada como de carácter obligatorio para el responsable de las descargas de las aguas residuales y emite entre otros, los siguientes parámetros que son de gran relevancia y se estarán tratando a lo largo de este trabajo: pH (unidades de pH) de 6 a 9 y Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO_5) de 200-400 mgO₂/L. Manejando

Importancia del Agua de Cola (AC)

En una planta procesadora, el método más común de producción de harina y aceite de pescado básicamente consiste en el cocinado a vapor, prensado y secado del pescado. El licor obtenido durante el prensado se somete a un proceso de decantación y luego de centrifugación, de donde se obtiene aceite de pescado sin refinar y AC entera. Por lo tanto, el AC es el producto resultante de la centrifugación del líquido resultante del decanter (Green y col., 1976). Es una emulsión de aceite en agua, en el cual el aceite es acompañado por proteínas y otros materiales orgánicos. El AC se considera como un sistema complejo de partículas insolubles (0.1-100 μ m), coloides (0.1-1 μ m), glóbulos de grasa (0.1-10 μ m), proteínas (1-100 KDa) y iones disueltos. Por lo general, su composición es: sólidos totales (8-10%), proteína (5-7%), grasa (0.3-0.6%), cenizas (1.8-2.3%) y un pH de 6 a 7. No

obstante, esta pueden variar dependiendo de la composición inicial de la especie, de las condiciones de almacenamiento del pescado y de las condiciones de operación de la planta (Castillo y col., 1987; Del Valle y Aguilera, 1990; Del Valle y Aguilera, 1991; Goycoolea y col., 1997; Guerrero y col., 1998).

El AC generada del proceso de reducción representa aproximadamente el 60% del peso total del pescado utilizado como materia prima. Esto es de suma importancia, puesto que además de poseer una gran cantidad de materia orgánica, el AC en la mayoría de los casos se descarga directamente al mar, lo que ha llegado a provocar contaminación de bahías, como en Galicia (España) (Wu y col., 2002); en la Región VIII de Chile (Roeckel y col., 1996) y en las bahías de Chancay y Ferrol en Perú (Cabrera, 2001; Guillén y col., 1998) y de Ensenada, (B.C), Guaymas y Yavaros (Sonora) en México (Miller y col., 2001). Particularmente en la bahía de Guaymas se vierten al año cerca de 8,756 ton de sólidos que corresponden aproximadamente a 120 mil ton de AC; mientras que en Yavaros se vierten cerca de 26,100 ton (Irlanda, 2002; López y Lechuga, 2001).

Aunado a los problemas de contaminación, en las plantas reductoras que no tratan el AC puede haber pérdidas económicas al no recuperar los sólidos presentes. Al respecto, una planta con capacidad de procesar 50 ton sardina/hora, generará cerca de 30 ton de AC por hora. Si en una temporada se producen 60,000 ton de AC, se podrían recuperar aproximadamente 4,800 ton de sólidos, tomando en cuenta que el AC contiene 8% de sólidos, esto representaría una producción complementaria de 5,328 t de harina; si el

costo por tonelada de harina es de alrededor de 1000 USD (Josepeit, 2007), entonces se estarían perdiendo o recuperando mas de 5 millones de dólares en una temporada (Bimbo, 2002; Cuadros-Dulanto, 1994; Dornier y Bennasar, 1991).

Actualmente se han implementado métodos para la recuperación de sólidos (proteínas), simultáneamente con el tratamiento del AC; algunos de éstos se describen en la siguiente sección.

Procesos de Recuperación de Sólidos de AC

Los procesos de recuperación se dividen en unidades de proceso y operaciones unitarias. Las unidades de proceso comprenden la adición de sustancias químicas o biológicas, mientras que las operaciones unitarias son aquellas en las que predominan las fuerzas físicas. En la industria pesquera se emplean ambas para la remoción de sólidos suspendidos y disueltos (Tchobanoglous y col., 2003c). A continuación se presenta una descripción general de los métodos industriales que están documentados para la recuperación de sólidos.

Evaporación

La evaporación es utilizada con el fin de recuperar sólidos provenientes del AC. En esta se eliminan grandes cantidades de agua concentrándola para finalmente someterla a un proceso de secado. Lo anterior requiere de calor normalmente en forma de vapor, parámetro de

suma importancia en el consumo de energía. El consumo de vapor es de 0.65 kg, 0.45 kg y de 0.35 kg por kg de agua evaporada en evaporadores de doble, triple y cuádruple efecto respectivamente. Esto evidencia que los evaporadores de múltiple efecto son más económicos que los de una sola etapa. No obstante, el factor que finalmente determina que tanto va a concentrarse el agua de cola sin tener problemas operativos es su viscosidad, la cual aumenta en las etapas finales de la concentración. La concentración máxima de sólidos del AC en la etapa final de la evaporación puede ser de 30 a 50%.

Como se mencionó anteriormente, esto eleva drásticamente la viscosidad del AC, llegando en algunos casos a valores superiores a los 500 cP, lo cual se asocia normalmente con problemas operacionales de taponamiento de tuberías y como consecuencia la interrupción del flujo de fluidos. Por lo anterior es importante la mayor eliminación posible de los sólidos mediante procesos previos a la evaporación (Del Valle y Agullera, 1990; F.A.O, 1986), o bien dar un tratamiento previo para la reducción de la viscosidad como lo es el tratamiento enzimático. Se han propuesto tratamientos enzimáticos previos a la evaporación con el fin de reducir la viscosidad al hidrolizar las proteínas de alto peso molecular. Con el proceso enzimático utilizando proteasa de *Cucurbita ficifolia* (calabaza) se ha logrado reducir la viscosidad del AC y aumentar la concentración de sólidos por evaporación a más del 50% (Schaffeld y col., 1989). Resultados similares se obtuvieron con enzimas alcalasa y neutrasa (Jacobsen y Rasmussen, 1984). A nivel industrial, el uso de estas enzimas aumento la

capacidad de evaporación del AC en un 74% comparada con AC no tratada (Jacobsen, 1985).

Precipitación Fisicoquímica

La precipitación química involucra la adición de sustancias químicas para alterar el estado físico de los sólidos disueltos y suspendidos y facilitar con ello su remoción por sedimentación. Durante varios años se han utilizado diferentes sustancias como precipitantes. El grado de clarificación obtenida depende de la cantidad de químicos utilizados y del cuidado que se tenga en el control del proceso. Por medio de la precipitación es posible obtener un efluente claro y libre de materia en suspensión (Schaffeld y col., 1989). Los ácidos y bases son agentes precipitantes muy efectivos en la recuperación de proteínas en solución acuosa. La acidificación no sólo precipita proteínas, sino también elimina las cargas negativas de los grupos carboxilos de moléculas grasas y con ello conduce a la reducción en la solubilidad del aceite de pescado (Del Valle y Aguilera, 1990).

(Welsh y Zali, 1979), precipitaron proteínas de pescado en aguas residuales ajustando su pH al punto isoeléctrico (pH=3.8-4.9), donde la solubilidad de las proteínas generalmente disminuye como resultado de la desnaturalización. En otra investigación, se colectó proteína precipitada a pH 4 a partir de agua de desecho en la producción de almeja. Los resultados demostraron que la precipitación de proteínas con H_2SO_4 10 N es relativamente simple y eficiente para reducir la carga orgánica del agua

residual, además de recuperar una gran cantidad de proteína (Hang y col., 1980).

Las proteínas en solución acuosa también pueden precipitarse por medio de tratamiento térmico y ajuste de pH. En un estudio realizado en AC de arenque del atlántico (*Brevoortia tyrannus*) se reportó la máxima recuperación de sólidos a pH 4 y temperatura de 60-80°C (Castillo y col., 1987); mientras que en AC proveniente de fábricas de harina pescado en Mar de la Plata Argentina, la mayor recuperación de sólidos fue a pH 5.8 y temperaturas entre 60-65°C (Civit y col., 1982). En AC de fábricas de harina de pescado en Chile se encontró la menor solubilidad de sólidos a un pH 5 y a una temperatura de 90°C (Del Valle y Aguilera, 1990). En agua de cola de fábricas de harina de pescado en Galicia, España, se obtuvo un 80% de remoción de sólidos a pH 8 (Guerrero y col., 1998). La recuperación de la mayor cantidad de sólidos en AC representa una de las etapas primarias del tratamiento de este efluente. Sin embargo, en ocasiones la eliminación de pequeñas partículas coloidales no es del todo eficiente, por lo que se requiere formar aglomerados mayores lo cual haría más sencilla su eliminación por procesos como sedimentación y centrifugación. Para formar dichos aglomerados, de manera que puedan removerse más fácilmente, se han utilizado diferentes agentes floculantes/coagulantes.

Para comprender el papel que ejercen los floculantes/coagulantes en la remoción de partículas coloidales, es importante conocer las características de las partículas encontradas en el agua de desecho o AC tales como: a) tamaño y concentración, b) forma y flexibilidad, c)

propiedades de superficie, incluyendo características eléctricas, d) interacciones partícula-partícula y, 5) Interacciones solvente-partícula (Tchobanoglous y col., 2003a).

Con el objetivo de recuperar la mayor cantidad de sólidos se han propuesto una diversidad de agentes floculantes/coagulantes como las sales cationicas divalentes y trivalentes. Se han propuesto también polímeros cargados (polielectrolitos), incluyendo gomas y derivados polisacáridos de plantas (alginatos, carrageninas, carboximetilcelulosa) y de animales (quitosano) (Del Valle y Aguilera, 1990). En un estudio realizado con el efluente resultante del enlatado de camarón, se encontró la mayor eficiencia con dos sales utilizadas como agentes coagulantes. Con cloruro férrico, se obtuvo un 87% de claridad (transmitancia) en el efluente después de 30 minutos de reposo a un pH 6.6; mientras que con sulfato férrico, se obtuvo un 63% en el mismo tiempo a un pH 5.8 (Toma y Meyers, 1975). Doce años más tarde, se utilizaron lodos activados (impact 150) con el fin de recuperar sólidos provenientes de AC de arenque del atlántico (*Brevoortia tyrannus*); en este experimento, se logró recuperar alta cantidad de sólidos consiguiéndose transmitancias hasta de un 99% (Castillo y col., 1987).

En un experimento donde se emplearon efluentes producto del procesamiento de langostino, se observaron resultados favorables en la recuperación de sólidos a un pH de 6. La concentración de sólidos suspendidos y turbidez disminuyeron en un 97% y 83% respectivamente; la reducción en la demanda química de oxígeno (DBO) fue de un 45% (No y Meyers, 1989a). Por otra parte, se demostró también que el quitosano es un

excelente sustrato polimérico para una alta recuperación de un gran número de aminoácidos (excepto alanina y cisteína) en efluentes provenientes del procesamiento de langostino a pH entre 8 y 10 (No y Meyers, 1989b). Guerrero y col. (1998), recuperaron 97% y 75% de proteínas utilizando poliacrilato de sodio y quitosano respectivamente, en AC de la industria reductora en Galicia España (Guerrero y col., 1998).

Sistemas a base de membranas

La filtración involucra la separación de partículas y materia coloidal de un líquido. El papel de la membrana es servir como una barrera que permite el paso de ciertos constituyentes y el de retener otros. Los procesos de separación por membranas incluyen la microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF), osmosis reversa (OR), diálisis y electrodiálisis (ED) (Tchobanoglous y col., 2003b). En la MF y UF existen diferentes configuraciones del proceso; una de ellas, es por medio de sistema de filtración de membrana en flujo cruzado. Este tipo de membrana tiene aplicación en la industria pesquera aunque no es muy frecuente su uso. Algunas de sus aplicaciones es en el tratamiento de aguas residuales, recuperación de proteínas y en la producción de hidrolizados y concentrados de proteína de pescado; así como en las diferentes etapas de la línea de procesamiento de camarón, en donde la concentración de proteína en aguas residuales varía de 0.1% a 0.6% y al aplicar el proceso de UF se ha logrado concentrar por encima del 6%, recuperando con ello gran cantidad de proteínas (Almas, 1985).

También se ha validado experimentalmente el tratamiento de AC por medio de UF, lográndose concentrar los sólidos totales hasta un 42%, con lo cual se demostró que esta tecnología puede competir con el evaporador, de forma ventajosa ya que la limpieza de la membrana es mas fácil y rápida que la del evaporador (Hart y Souires, 1985).

La MF y UF también se han utilizado para recuperar proteínas del efluente proveniente del procesamiento de surimi. La producción de surimi puede verse incrementada hasta en 1.7% añadiendo la proteína recuperada por MF, sin la disminución de las propiedades funcionales de este material proteico. El uso de UF provee también la posibilidad de reciclar el agua del proceso. Sin embargo, las proteínas obtenidas presentaron un considerable color oscuro y olor fuerte (Lin y col., 1995). Una aplicación más de la MF y UF fue en efluentes de industrias harineras en Chile, donde se observó que la UF redujo la cantidad de materia orgánica y permitió la recuperación de gran cantidad de material proteico; sin embargo, el estudio recomendó el uso de nanofiltración (NF) con el fin de aumentar la recuperación de proteínas de esos efluentes (Afonso y Borquez, 2002). La NF se utilizó en efluentes del procesamiento de surimi, mostrando que esta tecnología es capaz de reducir la demanda química de oxígeno en un 93% y los sólidos totales en un 87% (Wu y col., 2002).

En los procesos de separación de sólidos por medio de membranas es muy común el taponamiento de las superficies de las membranas, ya sean de MF, UF, NF u OR. En años recientes se han propuesto nuevas tecnologías de membranas, las cuáles teóricamente no son susceptibles al

taponamiento por partículas finas o moléculas orgánicas muy grandes. La membrana Donnan o Diálisis Donnan es una de ellas, en el que se genera un gradiente de potencial electroquímico a través de una membrana intercambiadora de iones (Prakash y Sengupta, 2003).

Sistemas por flotación

El BAF (Bubble Accelerated Flotation system) o sistema de flotación por burbujas de aire, tiene como base fundamental la tecnología tipo ASH (air sparged hydrocyclone). Básicamente consiste en dos etapas: la primera, es la aireación del agua de desecho en una cámara donde se forman pequeñas burbujas que colisionan entre ellas y atrapan al mismo tiempo los sólidos contaminantes; la segunda etapa, consiste en la separación de los sólidos agregados en las burbujas (aerofloculos) en tanques de separación. Por medio de esta tecnología se han obtenido buenos resultados en la remoción de sólidos suspendidos en aguas residuales de la industria pesquera en Ensenada, B.C. (México), lográndose reducir hasta un 79% de la demanda química de oxígeno (DQO). Sin embargo, los contaminantes solubles y coloidales menores a 1 micrón no pudieron removerse eficientemente (Miller y col., 2001).

En el tratamiento de efluentes de la industria pesquera también se ha utilizado el sistema conocido como flotación por aire disuelto (DAF, por sus siglas en inglés). Durante esta operación se eliminan no sólo el aceite o grasa sino también sólidos suspendidos. En este sistema el efluente es presurizado en un tanque cerrado, después pasa a través de una válvula de

reducción de presión, posteriormente pasa al tanque de flotación, donde debido a la reducción repentina de la presión se forman pequeñas burbujas de aire del orden de 50-100 micrones de diámetro; las burbujas tienden a subir y es entonces que los sólidos suspendidos, partículas de grasa se adhieren a la superficie de la burbuja acarreándolos a la superficie. Es muy común usar sustancias químicas para aumentar la eficiencia del proceso (González, 1996). Este método has sido utilizado durante el procesamiento del salmón de la planta Salmon Processing Factory Laschinger en Alemania, donde se han llegado a reducir en un 77% los niveles de DQO y en un 72% los niveles de DBO_5 (Huber technology Inc., 1997).

Potencial de Los Subproductos de la Industria Pesquera como Ingredientes Funcionales y Suplementos Nutricionales

Es conocido que del 50 al 60% de la captura de especies marinas se destina para consumo humano; la otra parte, no sólo se utiliza como subproducto, sino que también gran parte se elimina como desecho. Por ello, en los últimos años ha habido un creciente interés por esta área de investigación. Los subproductos se han visualizado como una fuente potencial de productos de valor agregado, en lugar de desechos. Dichos subproductos contienen fracciones con valor como: proteínas, lípidos, vitaminas y minerales. La fracción mayoritaria de los subproductos es utilizada en alimento para ganado, mediante la producción de harina y aceite de pescado; no obstante, la mejor rentabilidad la brindan los productos

destinados para consumo o uso humano como: enzimas extraídas y purificadas, péptidos bioactivos y biopolímeros para aplicaciones biotecnológicas o farmacéuticas (Asbjorn, 2004; Rustad, 2003).

Con respecto a los nutrientes, como las proteínas, estudios realizados en Alaska mostraron que los hidrolizados derivados del arenque (*Cuplea harengus*) son fuente potencial de péptidos y aminoácidos de calidad y que estos hidrolizados poseen color agradable, propiedades antioxidantes, solubilidad, absorción de grasa y estabilidad de la emulsión (Sathivel y col., 2003).

Las investigaciones en esta área han demostrado las bondades de los subproductos de origen marino, como es el caso de los polvos de proteínas solubles e insolubles de halibut (*Atheresthes stomias*) y arenque (*Cuplea harengus*) con potencial para utilizarse como ingredientes funcionales, complementos nutricionales y emulsificantes (Sathivel y col., 2004; Sathivel y col., 2005). De igual forma, el AC proveniente de subproductos (cabezas, colas, vísceras y piel) de abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*) y salmón (*Onchorhynchus*), posee características nutricionales y funcionales para poder emplearse como mejoradores de sabor en piensos para animales y acuicultura (Bechtel, 2005). Adicionalmente a lo anterior, se evaluaron polvos proteicos provenientes de proteínas solubles de cabezas, colas, vísceras, piel y mezclas de recortes de abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*). Los resultados mostraron que el contenido de aminoácidos de todos los polvos proteicos excedían los requerimientos para humanos concluyendo que este tipo de polvos proteicos pueden ser usados en la

industria de alimentos debido a sus propiedades funcionales y nutricionales (Sathivel y Bechtel, 2006).

Aunado a lo anterior, el colágeno ha demostrado poseer potencial en la industria farmacéutica y de alimentos, por lo que la demanda de éste y de la gelatina por la industria alrededor del mundo es considerable y sigue creciendo. Al respecto, los subproductos del procesamiento de la industria pesquera son una fuente potencial de colágeno y la gelatina es empleada como aditivo para aumentar la textura, capacidad de retención de agua, capacidad de retención de aceite, estabilidad durante el cocinado, capacidad de emulsificación y espumeo en numerosos productos alimenticios. La calidad y aplicación específica del colágeno y gelatina extraídos está altamente relacionada con sus propiedades funcionales y su pureza. No obstante, durante la extracción de colágeno de subproductos marinos se presenta abundancia de pigmentos y presencia de olores a pescado. Adicionalmente, se ha reportado que el colágeno de organismos marinos no forma geles fuertes, con lo cual se restringe su potencial de aplicación. Sin embargo, puede ser utilizado en aplicaciones industriales como micro-encapsulador, en pegamentos de secado rápido y cubiertas sensibles a la luz. También hay un mercado en la industria de cosméticos como ingrediente activo en shampoos con proteínas.

El uso de colágeno y gelatina de pescado también han generado nuevas aplicaciones en la industria de alimentos y en culturas donde no se acepta este tipo de productos provenientes de mamíferos, además, que debido al hallazgo de la encefalopatía espongiforme bovina (BSE), el

consumidor se ha vuelto más exigente y consciente de su salud, por lo que se está aceptando de mejor manera la fuente de colágeno y gelatina proveniente de fuentes marinas (Kim y Park, 2005; Kim y Mendis, 2006; Rustad, 2003).

Otro componente muy importante derivado de fuentes marinas es la protamina, la cual es un péptido básico que contiene más del 80% de arginina. Esta se ha encontrado en los testículos de más de 50 especies de pescado y se ha utilizado como agente antibacterial en el procesamiento de alimentos. Se ha demostrado que muchas proteínas poseen actividad antioxidante y los hidrolizados de pescado no son la excepción (Kim y col., 2001; Kim y Mendis, 2006; Rustad, 2003). Aunado a lo anterior, se ha reportado que los péptidos de pescado son capaces de mejorar significativamente la disponibilidad de absorción del calcio en sistemas biológicos (Kim y Mendis, 2006). Los subproductos de pescado son utilizados en muchas industrias y sus aplicaciones comerciales se han expandido año con año. Sin embargo, su aplicabilidad como compuestos bioactivos y valor nutracéutico no ha sido estudiado lo suficiente, lo que hace necesario futuras investigaciones al respecto para dar una aplicación en la promoción de la salud del humano (Kim y Mendis, 2006).

Uno de los productos principales derivados del pescado es la manufactura de harina de pescado. Esta un alimento muy popular para animales (ganado bovino, porcino, aves y acuicultura) debido a su alto valor nutricional. Normalmente, la harina procesada correctamente posee un alto nivel de aminoácidos esenciales (especialmente lisina), vitaminas del

complejo B, colina, niacina, ácido pantoténico, riboflavina y minerales que incluyen al calcio, cobre, hierro, fósforo y otros minerales traza. La popularidad de la harina de pescado también es atribuible a la baja cantidad de fibra y a la forma tan fácil de obtenerla. La calidad nutricional y digestibilidad de la harina son afectadas por la composición y calidad de la materia prima y las condiciones del proceso. Aunque se han reportado diferencias en el contenido de proteínas en harinas de pescado de diferentes orígenes, el perfil de aminoácidos sigue siendo similar. Este perfil es análogo al requerido para el crecimiento del ganado bovino. El empleo de harina de pescado tiene ventajas significativas en la suplementación de dietas animales siempre y cuando se tome en cuenta el estado del animal y la calidad de los ingredientes dietarios (Hussein y Jordan, 1991; Ockerman y Hansen, 2000; Sandbol, 1993)

VI.- MATERIALES Y METODOS

Materia Prima

Se tomaron muestras de AC y agua del condensador directamente del proceso de producción de harina de sardina en la empresa Propeguay S.A. de C.V., en la ciudad de Guaymas, Sonora. El AC provenía de diferentes mezclas de pelágicos comúnmente utilizados para la elaboración de harina, entre las que se cuentan: sardina monterey (*Sardinops sagax caerulea*), anchoveta californiana (*Engraulis mordax*), anchoveta del pacífico (*Cetengraulis mysticetus*) y macarela (*Scomber japonicus*). El agua del condensador considerada por la industria como el efluente final listo para eliminar al mar fue muestreado directamente de la salida del evaporador. Se realizaron un total de 7 muestreos de AC y 4 de agua del condensador durante el periodo 2005-2006. La colección de las muestras se llevó a cabo en recipientes de plástico provistos de tapón de rosca, con capacidad mínima de 2 L. Los recipientes fueron colocados en hielo dentro de una hielera para ser enfriados y trasladados al laboratorio de calidad de productos pesqueros del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD). Cada uno de los recipientes fue etiquetado con el nombre del producto, hora, fecha y sitio del muestreo.

Estrategia Experimental

La estrategia experimental estuvo dividida en dos etapas. La primera comprendió: Tratamiento del AC para generar AC centrifugada (ACC), aplicación de los tratamientos experimentales al ACC, medición de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5), demanda química de oxígeno (DQO) y % de transmitancia, composición proximal (ACC, sólidos recuperados y efluentes generados), medición de radio hidrodinámico por dispersión de luz, nitrógeno de bases volátiles totales (BVT-N) y de trimetilamina (TMA-N). En la segunda etapa se realizó la caracterización

química y funcional de los sólidos recuperados por medio de cuantificación de proteína, aminoácidos, perfil electroforético, cuantificación de colágeno, medición de índice de blancura y su estabilidad, solubilidad, capacidad de emulsificación, estabilidad de la emulsión y finalmente digestibilidad in Vitro.

Tratamientos

Los tratamientos se aplicaron en el siguiente orden: Una centrifugación complementaria al AC, como operación unitaria adicional, utilizando una centrifuga refrigerada Beckman modelo J2-21 (GMI, Inc., Minnesota, USA) a 14,300xg/12.5 min/20°C, seguido de ajustes de pH en del ACC. Durante esta parte del tratamiento se realizaron estudios preliminares con el objetivo de seleccionar al agente alcalinizante y los tratamientos experimentales finales, mismos que serán detalladas mas adelante. El efluente final resultante del tratamiento químico de ajuste de pH fue sometido a UF.

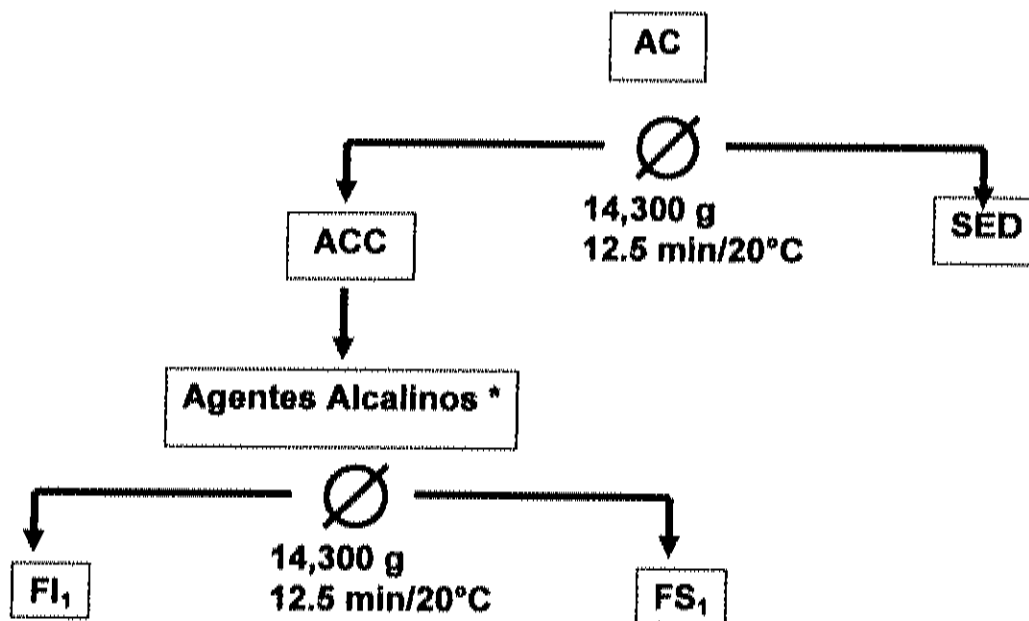
Estudios Preliminares. Se llevaron a cabo con el fin de seleccionar el mejor agente alcalinizante para la recuperación de sólidos, así como el pH óptimo de remoción de sólidos. Se evaluaron varios agentes alcalinizantes como $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 5N, NaOH 5N, Na_2CO_3 5N y cal común al 5% (Figura 1). El rango de pH evaluado fue de 7 a 9.5, con intervalos de 0.5 unidades. Una vez ajustado el pH, se volvió a centrifugar con las condiciones antes descritas. Después de esta centrifugación se obtuvieron dos fracciones, las cuales se nombraron fracción insoluble (FI_1) y Fracción soluble (FS_1). Se determino la composición proximal de ambas fracciones y la transmitancia (%) a la FS_1 . Se seleccionó al mejor agente alcalinizante y se prosiguió con la segunda parte de la etapa preliminar para establecer las condiciones de mayor recuperación de sólidos.

Tratamientos Experimentales. Se realizaron dos experimentos con ajustes de pH en la zona alcalina y ácida, con el fin de seleccionar el de mejor resultado en cuanto a la composición proximal del efluente final generado

(FS₂). En la zona ácida se empleó HCl (ácido clorhídrico 6M) y TCA (ácido tricloroacético al 10 y 40%). El primer tratamiento consistió de la adición de NaOH al ACC seguida de una centrifugación con las condiciones anteriormente descritas (Figura 2); la fracción soluble obtenida en este punto se denominó FS₁. Esta se trató seguidamente con TCA al 10% relación 1:2 y en otra corrida con HCl y se centrifugó de nueva cuenta. Las fracciones obtenidas se denominaron FI₂ y FS₂; se les determinó su composición proximal a ambas y en el caso de la FS₂ también su transmitancia (%), DBO₅ y DQO.

El segundo tratamiento (Figura 3) consistió primeramente en una acidificación del ACC utilizando HCl y TCA en dos experimentos por separado. Seguido de lo anterior, se aplicó una centrifugación con las mismas condiciones descritas anteriormente. Las FI y FS obtenidas se denominaron FI₁ y FS₁. Esta última se ajustó a pH alcalino y se centrifugó para finalmente obtener las FI₂ y FS₂, las cuáles se analizaron posteriormente. De los dos tratamientos mencionados se seleccionó el de mejores resultados. A la FS₂ se le determinó además su radio hidrodinámico, BVT-N y TMA-N. Las fracciones insolubles se evaluaron química y funcionalmente.

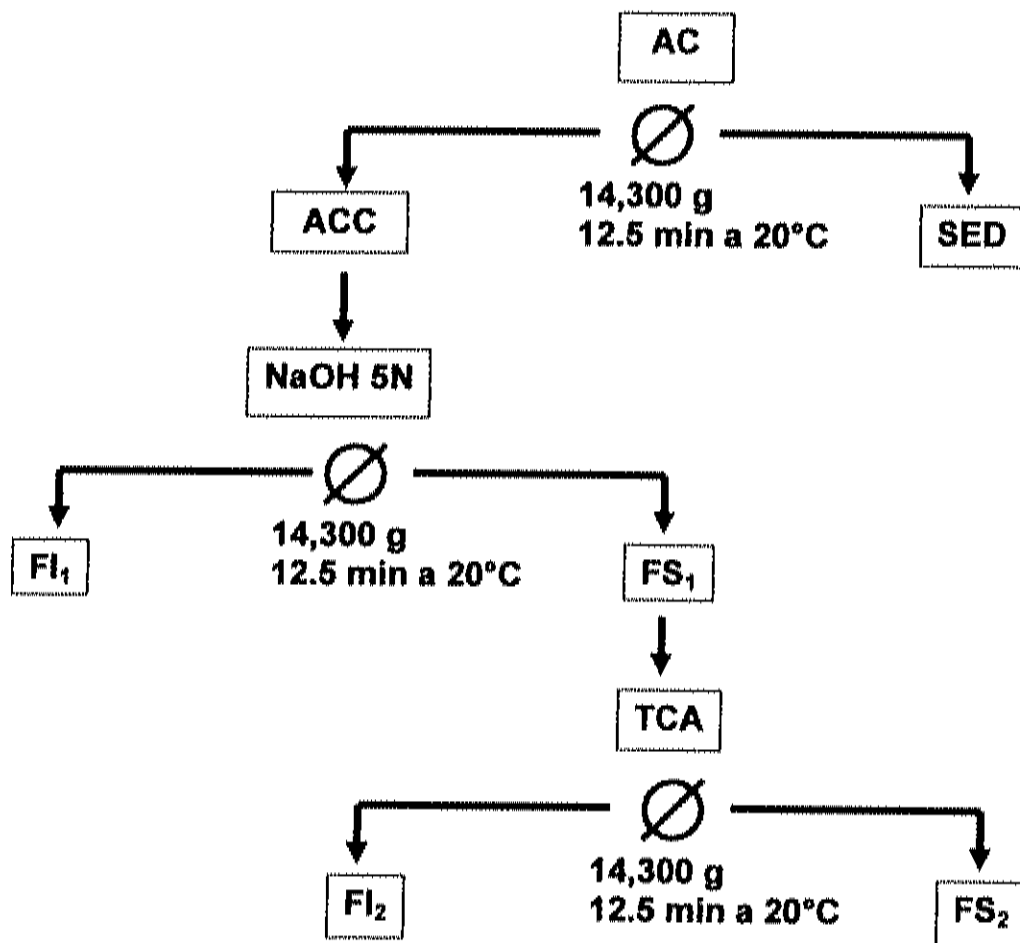
La FS₂ con mejores características composicionales se sometió a UF, concluyendo con ello la estrategia del tratamiento experimental (centrifugación-ajuste de pH-UF). Para la UF se utilizaron membranas de celulosa regenerada PLAC Prep/Scale TFF 6 ft² de 1 y 5 kDa MWCO (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Las condiciones de operación de presión y velocidades de flujo para ambos experimentos fueron de 1.2-1.3 bar y 20 ml/min respectivamente, utilizando una bomba peristáltica de velocidad variable Monostat Preston (Barnant Co., Barrington, IL), a pH 8.5/25°C. Las muestras se colectaron en modo de loop abierto



* $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 5N, NaOH 5N, Na_2CO_3 5N y cal común al 5%

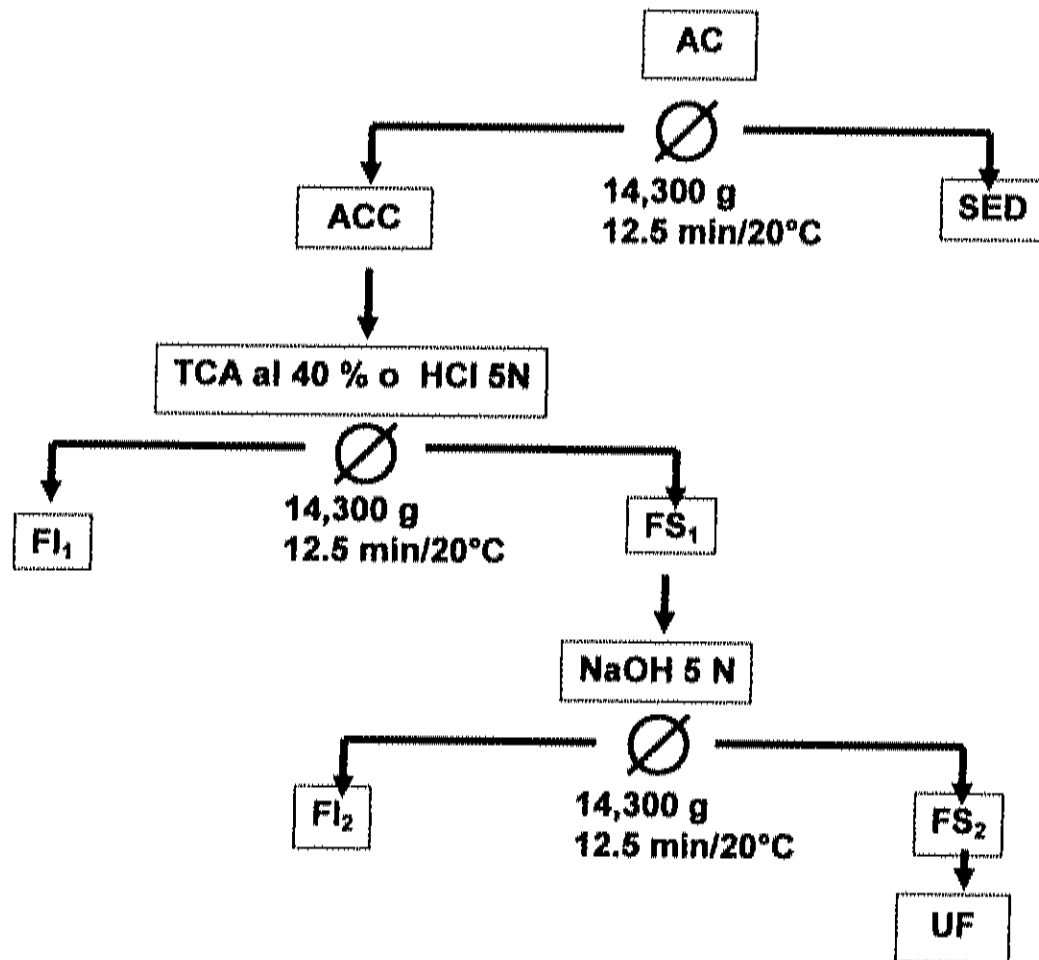
AC: Agua de cola. **ACC:** Agua de cola centrifugada. **SED:** Sedimentos.
FI₁: fracción Insoluble del tratamiento con los agentes alcalinos. **FS₁:**
 Fracción Soluble del tratamiento con los agentes alcalinos.

Figura 1. Diagrama de flujo de los tratamientos aplicados en el estudio preliminar.



AC: Agua de cola. ACC: Agua de cola centrifugada. SED: Sedimentos. FI₁: fracción Insoluble del tratamiento con NaOH. FS₁: Fracción Soluble del tratamiento con NaOH. TCA : Ácido Tricloroacético.

Figura 2. Diagrama de flujo del primer tratamiento experimental



AC: Agua de cola. **ACC:** Agua de cola centrifugada. **SED:** Sedimentos. **FI₁:** fracción Insoluble derivada del tratamiento con TCA o HCl . **FI₂:** Fracción insoluble derivada del tratamiento con NaOH. **FS₁:** Fracción soluble derivada del tratamiento con TCA o HCl. **FS₂ :** Fracción soluble derivada del tratamiento con NaOH

Figura 3. Diagrama de flujo del segundo tratamiento experimental

Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅)

Se midió según la Norma Mexicana NMX-AA-028-SCFI-2001 (Dirección General de Normas, 2001a). Esta se basa en medir la cantidad de oxígeno que requieren los microorganismos para efectuar la oxidación de la materia orgánica presente en aguas naturales y residuales, y se determina por la diferencia entre el oxígeno disuelto inicial y el oxígeno disuelto al cabo de cinco días de incubación a 20°C. Para la determinación del oxígeno disuelto (OD) se usó un oxímetro Thermo Orion modelo 410, provisto de un electrodo Orion 97-08 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Se cuantificó según la Norma Mexicana NMX-AA-030-SCFI-2001 (Dirección General de Normas, 2001b). La muestra se colocó a reflujó con H₂SO₄ concentrado (con 15 g de sulfato de plata disuelto por cada litro de ácido) con un exceso conocido de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇). Se utilizó una chaqueta de calentamiento Electrothermal EMV1000/CEMK5 (Barnstead Internacional, Dubuque, Iowa, USA). Después de la digestión, el dicromato no reducido se midió por titulación con sulfato ferroso amoniacal y calculó la materia oxidable en términos de oxígeno equivalente.

Transmitancia

Se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 3B (Perkin Elmer Inc., Waltham, Massachusetts) a 575 nm, usando agua destilada como blanco (Castillo y col., 1987).

pH

La medición se efectuó de manera directa sobre el AC, ACC y los efluentes generados en el laboratorio. Para ello, se utilizó un potenciómetro Corning modelo 240 (Corning, New York, USA)

Radio hidrodinámico (R_H)

El R_H del AC, ACC y FS₂ se estimó por medio de la técnica de dispersión de luz (Juarez y col., 2007). Las mediciones se llevaron a cabo utilizando un sistema de correlación digital ALV-5000 (Langen-GmbH, Düsseldorf, Germany) provisto de un set de control de temperatura de 25 ± 0.1 °C. La luz incidente proveniente de un laser de argón fue polarizada verticalmente a $\lambda_0 = 632$ nm (30 mW); la luz dispersada se midió a 90° . El R_H se obtuvo en muestras diluidas a través de la relación de Stokes-Einstein: $D_0 = k_B T / 6 \pi \eta R_H$, donde k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, η la viscosidad del solvente, y D_0 el coeficiente de difusión a dilución infinita. Todas las mediciones fueron hechas por triplicado, cada una registrada en un intervalo de tiempo de 30 s y promediadas con el software del mismo equipo (ALV 5000/E/WIN Software).

Composición Proximal

Se llevó a cabo sobre las muestras liofilizadas de los 7 muestreos realizados, así como también en los sólidos recuperados producto de los tratamientos y en los efluentes generados durante el tratamiento. La determinación del contenido proteico se efectuó utilizando un analizador de nitrógeno total Leco FP-528 (Leco Corp., Saint Joseph, MI). El factor de conversión a proteína fue 6.25 y se reportó restándole el valor del nitrógeno no proteico (NNP) contenido en la muestra. La cuantificación de lípidos se llevó a cabo mediante el método 920.85 (AOAC, 2000). Para cuantificar cenizas, se tomaron 2 g de muestra liofilizada de los sólidos recuperados y 10 g de muestra de la fracción soluble generada. Estas se sometieron a incinerar a 550°C previa pre-incineración, según el método 938.08 (AOAC, 2000). La humedad y sólidos totales se realizaron por el método de estufa a 105°C , según el método 950.46 (AOAC, 2000).

La determinación de NNP se llevó a cabo añadiendo TCA al 10% a la muestra. Esta se homogenizó y centrifugó ($2000 \times g / 4^\circ\text{C} / 15$ min). Al sobrenadante se le cuantificó la cantidad de nitrógeno (Woyewoda y col., 1986).

Perfil de aminoácidos

La cuantificación de aminoácidos se realizó en muestras liofilizadas de AC, ACC y los sólidos recuperados por el tratamiento (FI). Las muestras se hidrolizaron con HCl 6M a 150°C por 6 h, aplicando vacío a los tubos de hidrólisis. Una vez hidrolizadas se evaporaron y se suspendieron y mantuvieron en buffer de citrato de sodio 0.2M (pH 2.2) hasta su análisis. Los aminoácidos se cuantificaron utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC) Hewlett Packard Modelo GMBH acoplado a un detector de fluorescencia (Hewlett-Packard Co., Waldbron, Alemania). Se utilizó el método de derivatización en precolumna de (Lindroth y Mopper, 1979) con modificaciones (Vázquez y col., 1995). Para ello se tomaron 200 μ L del extracto diluido (1:10) agua + 200 μ L de estándar interno (ácido L- α -amino n-butírico) y 600 μ L de agua HPLC. De esta nueva solución se tomaron 250 μ L y se colocaron en un jeringa provista con un filtro de 0.22 micras, para después adicionar 250 μ L de una solución de OPA (O-Phtaldialdehído) [(10 mg de OPA + 250 μ L de metanol + 37.5 μ L de solución Brij 35 + 25 μ L de β -mercaptoetanol, aforada a 10 mL con buffer de borato de potasio (pH 10.4)]. La mezcla se filtró y el líquido filtrado se colocó en un tubo Eppendorf ámbar de 1.5 mL. La muestra se derivatizó durante 2 min a 20°C, para posteriormente inyectarla al cromatógrafo provisto de un loop de 20 μ L. La separación de aminoácidos se llevó a cabo en una columna de fase reversa (Varian, Inc., Palo Alto, CA) C18 octa-decíl dimetilsilano de 10 cm x 4.6 mm I.D. y un tamaño de partícula de 3 μ m conectada a una precolumna (3 cm x 4.6 mm de diámetro) empacada con el mismo material. En la separación cromatográfica se utilizó un gradiente con un flujo de 2 mL/min de 2 eluyentes (A: metanol 100%; B: 10% metanol, 90% de buffer de acetatos, pH 7.3). El área producida por la fluorescencia de los aminoácidos se registró e integró por el programa Chem Station (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA). Los aminoácidos se identificaron y cuantificaron de acuerdo al tiempo de retención y áreas comparadas con un estándar de aminoácidos. El contenido de triptofano y cisteína no fueron cuantificados.

Contenido de aminoácidos libres

Esta se llevó a cabo en AC, ACC y FS₂ obtenidas durante los tratamientos. Para obtener el extracto, la muestra se homogenizó con TCA al 10%, seguida de una centrifugación a 10,000 X g/15 minutos. El sobrenadante se utilizó para la cuantificación de aminoácidos, la cual se llevó a cabo de la forma anteriormente descrita (Lindroth y Mopper, 1979; Vázquez y col., 1995).

Contenido de Colágeno

Se realizó mediante la cuantificación de hidroxiprolina y prolina. El método consistió en una hidrólisis ácida (HCl 6M) de la muestra liofilizada y desgrasada en un tubo de hidrólisis con vacío a 150°C por 6 h. La muestra se evaporó y se suspendió en buffer de citrato de sodio 0.2M (pH 2.2). La derivatización previa a la cuantificación por HPLC se realizó haciendo reaccionar la muestra disuelta en buffer de boratos (pH 10.4) con el 7-cloro-4 nitrobenzo-2 oxa-1,3-diazol (NBD-Cl), para obtener un alto nivel de fluorescencia. La cuantificación se efectuó por HPLC con una columna RP C₁₈ octadecil-dimetilsilano de 10 cm x 4.6 mm I.D. y tamaño de partícula de 3 µm, acoplado a un detector de fluorescencia (330-418 nm). El contenido de colágeno se obtuvo mediante extrapolación utilizando el factor de conversión de 7.25 (Vázquez y col., 2004). En la separación cromatográfica se utilizó un gradiente con un flujo de 2 mL/min de 2 eluyentes (A: metanol 100%; B: 10% metanol, 90% de buffer de acetatos, pH 7.3). El área producida por la fluorescencia de los aminoácidos se registró e integró por el programa Chem Station (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA). Los aminoácidos se identificaron y cuantificaron de acuerdo al tiempo de retención y áreas comparadas con un estándar de hidroxiprolina y prolina. El contenido de triptofano y cisteína no fueron cuantificados.

Contenido de Minerales

La determinación de calcio (Ca^{++}), magnesio (Mg^{++}), potasio (K^+), fósforo (P^{3-}), sodio (Na^+) y Zinc (Zn^{++}) se realizó en muestras de AC, ACC y sólidos recuperados producto del tratamiento. Se utilizó el método de espectrofotometría de emisión por plasma inducido – acoplado (ICP-OES, por sus siglas en inglés), según la Norma Mexicana NMX-AA-051-SCFI-2001 (Dirección General de Normas, 2001c). Se utilizó un equipo Perkin-Elmer Optima 2100 DV acoplado a un automuestreador AS-93 (PerkinElmer, Inc. Alle Rechte vorbehalten, Germany). Para la digestión de la muestra se utilizó un sistema acelerado de reacción por microondas a temperatura de 210°C con un equipo MARS Xpress (CEM Corporation, Matthews, NC).

Medición del color

Se midió color a AC, ACC y FI. La medición se llevó a cabo en muestras liofilizadas. Las tomas se hicieron sobre fondo blanco, con un espesor aproximado de 2 mm. Se empleó el sistema de colorimetría tri-estímulo en moda de reflectancia, utilizando un colorímetro portátil Konica Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japón). Se obtuvieron los valores de "L" (luminosidad), "a" (matiz rojo-verde) y "b" (matiz amarillo-azul). A partir de estos valores se calcularon el ángulo de matiz (Θ) y el índice de blancura (IB) mediante, las siguientes fórmulas:

$$\Theta = \text{Arctang}(b/a)$$

$$\text{IB} = 100 - [(100-L)^2 + a^2 + b^2]^{1/2}$$

Estabilidad al Índice de blancura

Se evaluó en AC, ACC y FI. La medición se realizó en muestras liofilizadas; las tomas se hicieron sobre un fondo blanco, con un espesor aproximado de 2 mm. El almacenamiento para evaluar la estabilidad fue por cuatro meses a temperatura ambiente (25°C), en frascos cerrados de plástico opacos y bajo la oscuridad. Se empleó el sistema de colorimetría tri-estímulo en moda de reflectancia, utilizando un colorímetro portátil Konica

Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc., Osaka, Japón). El IB se calculó mediante la fórmula anteriormente descrita.

Perfil Electroforético

Se llevó a cabo por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con duodesil sulfato de sodio (SDS-PAGE), utilizando marcadores específicos (Laemmli, 1970). Se prepararon geles discontinuos de 0.75 mm de grosor, de 12% para el gel de separación y 4% para el de inyección. Se inyectaron 60 µg de proteína y 5 µg de estándar de amplio rango (Bio-Rad-161-0317). Para la corrida se utilizaron una cámara y fuente de poder Bio-Rad Power Pac 3000 (Bio-Rad Lab., Hercules Ca), a 15 mA por gel. La tinción de las bandas se llevó a cabo utilizando azul de comassie.

Digestibilidad *in vitro*

La digestibilidad proteica aparente se llevó a cabo por medio de la técnica de multienzimas (Hsu y col., 1977), con modificaciones (Saterlee y col., 1979). Se utilizaron muestras liofilizadas las cuales se pasaron por una malla número 80. A 10 mL de agua destilada se le añadieron 6.25 mg de proteína/mL y se dejaron hidratar al menos 1 h con agitación constante. Se equilibrio la solución de enzimas (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.) conteniendo 1.6 mg de tripsina, 3.1 mg de quimotripsina y 1.3 mg de peptidasa por mL de agua destilada a 37°C y pH 8. Después de esto la solución con enzimas se mantuvo en hielo. La muestra también se equilibrio a pH 8 y 37°C, para seguidamente añadirle el pull de enzimas. A los 10 minutos de la reacción, se adiciono una solución de proteasa (7.95 mg/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO.) y se aumentó la temperatura del baño a 55 C. A los 9 minutos de reacción, la temperatura se llevó a 37°C. Se registró el pH del hidrolizado (pH a los 20 minutos), después de 10 minutos que la muestra recibió la proteasa bacteriana. La digestibilidad *in vitro* de la proteína se calculó usando la siguiente ecuación:

% Digestibilidad = $234.84 - 22.56 (X)$

Donde:

X= pH después de los 20 minutos de incubación

Para cada grupo de muestras se corrieron controles de caseinato de sodio y albúmina de huevo

Solubilidad del Nitrógeno

La solubilidad del nitrógeno proteico de los sólidos recuperados se realizó mediante la metodología propuesta por (Morr y col., 1985), con ligeras modificaciones. 10 mg de muestra liofilizada se dispersaron en 1 mL de NaCl 0.1 M a diferentes valores de pH (3, 5, 7, 9 y 11), ajustando con NaOH o HCl. La suspensión se agitó durante 1 h a 25°C y posteriormente se centrifugó a 2,560 x g/30 min. Al sobrenadante se le cuantificó la contenido de nitrógeno utilizando un analizador de nitrógeno total Leco FP-528 (Leco Corp., Saint Joseph, MI) (Gbogouri y col., 2004; Sathivel y Bechtel, 2006). El porcentaje de solubilidad del nitrógeno en las muestras se calculó como:

$$\% \text{ Solubilidad} = \frac{\text{Contenido de nitrógeno en sobrenadante}}{\text{Contenido de nitrógeno total}} \times 100$$

Capacidad de Emulsificación (CE)

La CE se midió por el método de titulación con aceite y resistencia eléctrica (Webb y col., 1970), con modificaciones (Sathivel y Bechtel, 2006). Se disolvieron y homogenizaron 200 mg de muestra liofilizada en NaCl 0.1 M. Se colocó un electrodo YSI 556 MPS (Multi Probe System; Yellow Springs, OH) en la solución y se procedió a homogenizar (60% de output) hasta conseguir una resistencia eléctrica (ohms) constante. El output de la homogenización se aumentó al 100% e inmediatamente se inició con la adición de aceite de soya "Pureta" (Escuintla, Guatemala C.A.) contenido en un embudo de separación a un flujo constante de 0.5 ml s⁻¹, generando una

emulsión a 25°C. Al tiempo de presentarse un aumento en la resistencia e inversión de fase observable, se interrumpió el flujo del aceite. Esta evidencia fue considerada como el punto máximo de la capacidad de emulsificación. Se midió el volumen de aceite emulsificado y el valor de CE se expresó como mL de aceite emulsificado por 200 mg de proteína.

Estabilidad de la emulsión (EE)

La EE se evaluó acorde con la metodología de Yatsumatsu (Yatsumatsu y col., 1972) modificada por Sathivel y Bechtel (2006). Se disolvieron 500 mg de muestra liofilizada en 50 mL de NaCl 0.1 M; seguidamente se adicionaron 50 mL de aceite de soya "Purela". La mezcla se homogenizó al 100% de output durante 2 minutos para formar la emulsión. Una vez formada la emulsión se tomaron alícuotas de 25 mL y se transfirieron a una probeta graduada, donde se dejaron reposar durante 15 minutos a 25°C. A los 15 minutos se registró la lectura del volumen acuoso observado. El por-ciento de EE se calculó como:

$$\% EE = \frac{\text{Volumen total} - \text{volumen acuoso}}{\text{Volumen total}} \times 100$$

Diseño de experimentos y análisis estadístico

El diseño de experimentos consistió en un diseño completamente al azar. Se realizaron siete muestreos y los tratamientos se aplicaron 4 veces (n=4); los análisis se llevaron a cabo por duplicado. Se aplicó un análisis de varianza de un sólo factor (ANOVA) y comparación múltiple de medias por Duncan, cuando fue necesario. Para todas las estadísticas se utilizó un nivel de significancia del 5% y el programa NCSS versión 5.1 (Kaysville, UT).

VII.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los resultados obtenidos de este trabajo de investigación se mostrarán a continuación. El esquema empleado en el escrito es por medio de manuscritos para publicación, los cuáles representan un total tres. El primer manuscrito por orden de aparición se titula "**The effect of a complementary centrifugation and pH shift treatment applied to stick-water from a fishmeal plant on the compositional characteristic of the final effluent**", el cual fue enviado a la revista Bioresource Technology y actualmente está bajo revisión, el número de asignación es BRT 07-77.

El segundo manuscrito se titula "**Compositional and physicochemical characterization of a final effluent derived from a novel multiple stages treatment of fishmeal stick-water**", enviado también a la revista Bioresource Technology y con número de asignación BRT 07-174, en estatus de revisión.

Finalmente el tercer manuscrito fue titulado "**Properties of recovered solids from stickwater treated by centrifugation and pH shift**", enviado a la revista Food Chemistry, el cual se encuentra en estado de revisión bajo número de asignación FOODCHEM-D-07-02429.

Se anexan a continuación los e-mails de recibo y número de asignación de la casa editorial.

Al finalizar la presentación de los manuscritos se presentan las conclusiones generales del trabajo, seguidas por la bibliografía empleada en esta investigación.

De: Steve Ricke <sricke@uark.edu>

Asunto: Re: reviewers for BRT 07-77 manuscript

Fecha: Mon, 21 May 2007 05:54:26 -0500

A: Celia Olivia Garcia Sifuentes <celia_olivia@estudiantes.ciad.mx>

This message was transferred with a trial version of CommunicGate(r) Pro

X-CIAD A.C.-MailScanner: Found to be clean

X-CIAD A.C.-MailScanner-From: sricke@uark.edu

Thank you for this list of potential reviewers.
Sincerely,
SC Ricke-editor

At 12:37 PM 5/19/2007, you wrote:

Dear. Dr. Ricke, Now Dr. Pacheco is providing the name and postal address of 4 potential U.S. reviewers who have expertise in this research area for the manuscript number BRT 07-77.

thanks in advance for your attention

Dr. Subramaniam Sathivel
 Fishery Industrial Technology Center
 118 Trident Way
 Kodiak, AK 99615-7401
 Phone: (907) 486-1535
 Fax: (907) 486-1540
 sathivel@sfos.uaf.edu

Dr. Peter J. Bechtel
 USDA-ARS Scientist
 233 O'Neill Building
 P.O. Box 757220
 SFOS/OAF
 Fairbanks, AK
 99775 USA
 office fax 907-474-7204
 office phone 907-474-2708
 Email. bechtel@sfos.uaf.edu

Dr. Don Kramer
 Professor, Seafood Quality Specialist
 Phone: 907.274.9695
 Fax: 907.274.5242
 E-mail: afdek@uaa.alaska.edu
 Marine Advisory Program
 1007 W 3rd Avenue #100
 Anchorage, AK 99501

Dr. Michael T. Morrissey
 Director,
 Director of OSU Seafood Laboratory
 Professor, Department of Food Science and Technology
 Oregon State University (Food Science)
 Marine Dr. Room 253, Astoria, Oregon, 97103
 Tel: (503) 325 4531. Fax: (503) 325 2753
 e-mail: Michael.Morrissey@oregonstate.edu

Dr. Steven C. Ricke
 Donald "Buddy" Wray Food Safety Endowed Chair
 and Director of the Center for Food Safety and Microbiology, IFSE
 Food Science Dept.
 University of Arkansas
 2650 North Young Avenue
 Fayetteville, AR 72704-5690
 TEL: (479)575-4678
 FAX: (479) 575-6936
 Email: sricke@uark.edu
 Web: <http://www.foodscience.uark.edu/ricke.html> -- Este mensaje ha sido analizado por MailScanner en busca de virus y otros contenidos peligrosos, y se considera que está limpio.

De: Steve Ricke <sricke@uark.edu>
Asunto: potential reviewers for BRT 07-174
Fecha: Sat, 10 Nov 2007 11:30:43 -0600
A: rpacheco@ciad.mx



Dear Author,

I have received your manuscript BRT 07-174 "Compositional and physicochemical..." and am having difficulty finding qualified reviewers from the editorial board of Bioresource Technology. Therefore, I would greatly appreciate if you could provide the names and complete postal addresses of 4 to 5 potential U.S./Canadian reviewers who have expertise in this research area and would have no conflict of interest with the authors. Please use the above BRT number in all correspondence regarding your manuscript. Thank you for your submission of this manuscript.

Sincerely,

S.C. Ricke, Editor-in-Chief Bioresource Technology

Dr. Steven C. Ricke
 Donald "Buddy" Wray Food Safety Endowed Chair
 and Director of the Center for Food Safety, IFSE
 Food Science Dept.
 Division of Agriculture
 University of Arkansas
 2650 North Young Avenue
 Fayetteville, AR 72704-5690
 TEL: (479)575-4678
 FAX: (479) 575-6936
 Email: sricke@uark.edu
 Web: <http://www.foodscience.uark.edu/ricke.html>

Dr. Steven C. Ricke
 Donald "Buddy" Wray Food Safety Endowed Chair
 and Director of the Center for Food Safety, IFSE
 Food Science Dept.
 Division of Agriculture
 University of Arkansas
 2650 North Young Avenue
 Fayetteville, AR 72704-5690
 TEL: (479)575-4678
 FAX: (479) 575-6936
 Email: sricke@uark.edu
 Web: <http://www.foodscience.uark.edu/ricke.html>

...
 Este mensaje ha sido analizado por **MailScanner**
 on busca de virus y otros contenidos peligrosos.

De: "Food Chemistry" <esubmissionsupport@elsevier.com>
Asunto: A manuscript number has been assigned. FOODCHEM-D-07-02429
Fecha: Tue, 27 Nov 2007 01:26:34 -0000
A: <celia_olivia@estudiantes.ciad.mx>, <cgs2408@yahoo.com.mx>

This message was transferred with a trial version of CommuniGate(r) Pro

X-MailScanner-Information Please contact the ISP for more information

X-CIAD, A.C.-MailScanner: Found to be clean

X-CIAD, A.C.-MailScanner-From: esubmissionsupport@elsevier.com

X-Spam-Status: No

Ms. Ref. No.: FOODCHEM-D-07-02429

Title: Properties of recovered solids from stickwater treated by centrifugation and pH shift
Food Chemistry

Dear celia,

Your submission entitled "Properties of recovered solids from stickwater treated by centrifugation and pH shift" has been assigned the following manuscript number: FOODCHEM-D-07-02429.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/foodchem/>.

Your username is:

Your password is:

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Liz Wang
Central Administrator
Food Chemistry

Este mensaje ha sido analizado por MailScanner en busca de virus y otros contenidos peligrosos, y se considera que está limpio.

For all your IT requirements visit: <http://www.transtec.co.uk>

**The effect of a complementary centrifugation and pH shift treatment
applied to stick-water from a fishmeal plant on the compositional
characteristic of the final effluent**

García-Sifuentes, C, Pacheco-Aguilar, R*, Carvallo-Ruiz, G, Goycoolea-
Valencia, F., Hernández-Martínez, J. and Torrescano-Urrutia, G.

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD)

Carretera a La Victoria km 0.6. P.O. Box 1735.

Hermosillo, Sonora, México, Cp 83000. Ph/Fax: +52(662)280-0421

***Correspondent Author.**

Ramon Pacheco-Aguilar, Ph.D.

Email rpacheco@cascabel.ciad.mx

Abstract

Stick-water (SW) produced by a sardine fishmeal plant in Northwestern Mexico was centrifuged (CSW) and the recovered effluent was treated for adjustments at acidic and alkaline pH's. Centrifugation of the SW removed 93% of its initial lipid content. The alkaline treatment by itself was not satisfactory for the reduction of neither the biochemical oxygen demand (BOD₅) nor the chemical oxygen demand (COD). However, the combination of alkaline and acid treatments followed by centrifugation resulted in a recovery of 60% of the total nitrogen compounds present (proteins, peptides, amino acids) and more than the 30% of the ash content in the CSW. The final effluent showed a 70% transmittance and a reduction above the 85% for the BOD₅ and COD levels (from 57,0000 mg/L to 4,900 mg/L for BOD₅ and from 166000 mg/L to 23,000 mg/L for COD) as compared with the untreated SW.

Key words: Stickwater, recovering of solids, centrifugation and pH adjustment.

1. Introduction

The untreated wastewater from the fish industry is a potential source of environmental contamination of shorelines and bays, reason by which such effluents must be treated before reaching the sea. In addition to reduce pollution, the treatment could be designed to recover suspended or dissolved solids with both economic and nutritional value (Ahumada et al., 2004; López and Lechuga, 2001; Miller et al., 2001; Roeckel et al., 1996).

Several by-products of great importance are generated during the wet process of fishmeal production, such as oil and stick-water (SW). The later alone could represent up to 60% of the initial raw material directed towards the process (Organización Panamericana de Salud, 2002). To avoid unloading the SW to the sea and causing contamination, several treatments such as evaporation and ultra-filtration (UF) have been implemented. However, those processes are not sufficiently efficient because the presence of soluble material, emulsified fat and colloidal particles in the SW are normally associated with operational problems such as plugging of ducts and pipes and interruption fluid pass, reasons by which a treatment of the SW previous to its evaporation/UF process is necessary. For those treatments, both biological and chemical protocols could be implemented (Ahumada et al., 2004; Del Valle and Aguilera, 1990; Jacobsen and Rammussen, 1984; Miller et al., 2001; Schaffeld et al., 1989).

This study was focused in the treatment of the SW generated by a fishmeal production plant in Northwestern Mexico by adding a complementary centrifugation as an additional unitary operational step to its

regular commercial operation routine along with further pH adjustments in both the alkaline and acidic zones of the new so-called centrifuged SW (CSW). The aim was to generate effluents with low ecological impact and to characterize the recovered solids.

2. Methods

2.1 Stick-water (SW)

SW samples were collected directly from the sardine reduction process in a fishmeal production plant located in Guaymas, Sonora, Mexico. The SW samples were from different mixes of sardine related species commonly used by the collaborating plant, such as Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*), Californian anchovy (*Engraulis mordax*), Pacific anchovy (*Catengraulis mysticetus*) and Chub mackerel (*Scomber japonicus*). After sampling, the SW was immediately transported to the laboratory for further analyses. The complementary centrifugation of the sampled SW was carried out in a centrifuge Beckman model J2-21 at $14,300 \times g/12.5$ min/20°C, and the effluent named centrifuged stick-water (CSW).

2.2 Preliminary study

In order to select the best alkali agent for solids recovery a preliminary study was carried out with evaluating several chemical agents [5N $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 5N NaOH, 5N Na_2CO_3 and 5% lime]. The flow diagram for this part of the study is shown in Figure 1. The pH range investigated in the alkaline zone was from 7.0 to 9.5 at 0.5 pH unit intervals. Once treated, the CSW was centrifuged again under the conditions previously mentioned. After centrifugation two fractions were obtained: a soluble fraction (SF) and an

insoluble fraction (IF). Both fractions were analyzed for solids, protein and ash percents; additionally, SF was analyzed for BOD₅, COD and % transmittance.

2.3 Experimental treatment

The CSW was treated with 5N NaOH and centrifuged as mentioned above. After centrifugation the SF thus obtained was further acidified with 1:2 10 % trichloroacetic acid (TCA) and centrifuged again obtaining a new IF and SF. This later fraction was considered the final effluent generated. The flow diagram of the experimental treatment is outlined in Figure 2.

2.4 Analytical techniques

A Corning pH meter model 240 was used for all pH measurements. Nitrogen content was carried out by using a Leco FP-528 nitrogen analyzer (Leco Corp., Saint Joseph, MI). Solids, moisture, protein, lipid and ash were calculated following the AOAC procedures AOAC, 2000a, b. Percent of light transmittance was measure using a spectrophotometer Perkin Elmer Lamda 3B, at 575 nm with distilled water used as a blank as recommended by Castillo et al., 1987). Finally, chemical oxygen demand (COD) and biochemical oxygen demand (BOD₅) were carried out according to the Mexican Norms (NMX) applied to industrial effluents (Dirección General de Normas, 2001a, b).

3. Results and Discussion

After centrifugation of the SW three different constituent layers were obtained: 1) A floating layer ($3.9 \pm 0.3\%$ w/w) of emulsified fat (EF), 2) an

intermediate liquid layer ($87.5 \pm 2.8\%$ w/w), named centrifuged stick-water (CSW) and 3) a bottom layer ($9.4 \pm 0.8\%$ w/w) of sediments (SED). The composite average composition for both SW and CSW is shown in Table 1. Data indicated a pronounced variation in composition for the SW samples taken during the study. This variation is due to the nature of the raw material used by the participating plant for the production of the fishmeal in a given run (Valdez, 2006).

The fishmeal composition, as well as that of the derived stick-water, varies depending of factors such as fish species and species mixes, season, physiological condition of fish, etc. (Bandarra et al., 1997; Bechtel, 2005; Del Valle and Aguilera, 1991; Sathivel et al., 2005). Protein content ranging from 70 to 86 % (d.w.) for SW derived from the processing of Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) and salmon (*Oncorhynchus sp*) was reported (Bechtel, 2005; Sathivel et al., 2005); also, a composition (d.w.) of 65% protein, 23% fat and 16.4% ash for menhaden (*Brevortia gunteri*) SW were reported (Castillo et al., 1987). Results in Table 1 also shows the impact of the complementary centrifugation step (CCS) in the initial chemical composition of SW. Remarkably, a significant difference ($p < 0.05$) in fat content was observed between SW and CSW. After the CCS the CSW still contains 57%, 64% and 82%, of the total solids, protein and ash, respectively, of those initially present in the SW, but only 5% of the lipid. The lower variation of the compositional data for CSW as compared with that of SW indicated that the CCS yields a more uniform effluent compositional-wise regardless of the initial source, meaning major technological advantages for

its treatment as well as for the maintenance of the involved processing equipment. Additionally, data for DBO_5 and DQO reflects the significant effect ($p < 0.05$) of the CCS in the removal (approximately 50%) of both organic and inorganic material. Results also indicated that most of the organic material dissolved or suspended in the CSW is protein.

In order to promote the separation of the solids present in the CSW, several alkali agents were evaluated [NaOH , Na_2CO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, common lime] as a preliminary study following the diagram outlined in Figure 1. From those agents, the best over-all results in terms of recovered solids and protein from IF_1 and SF_1 transmittance were for $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and lime (Table 2). From those results, it was decided to use the former compound in the second part of preliminary study as the alkalizing agent.

Data in Table 3 shows the effect of adjusting the pH of CSW with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ on the relative chemical composition of the SF_1 (Figure 1). Results indicated that regardless of the pH, most of the protein (>74%) and ash (>72%) remained in the SF_1 . A similar behavior in menhaden (*Brevortia gunteri*) SW exposed to pH changes, with an 80-89 % of protein still remaining in the supernatant (SF) after treatment was reported (Castillo et al., 1987).

The compositional data for SF_1 (Table 3) agreed with the high levels of BOD_5 (organic dissolved material) and COD (total organic and inorganic material) well above the maximum level allowed by the correspondent Mexican environmental regulation for industrial effluents of 200-400 mg/L and 400-480 mg/L, respectively (Procuraduría Federal de Protección al Medio

Ambiente, 1997). Maximal removals for BOD₅ and COD were 61.2% and 74.6%, respectively. Removal of 18 % in COD levels in SW produced by a fishmeal plant in Spain treated by NaOH (pH 7.1) was reported (Guerrero et al., 1998). Since quality of industrial effluents are mainly evaluated in terms of BOD₅ and COD, over-all results indicate that Ca(OH)₂ work the best in the 7-7.5 pH range, however showing by itself a low efficiency that need to be improved with additional treatments. Based in these results and in the fact that using large quantities of Ca(OH)₂ may cause a drawback due to possible crust formation in the industrial equipment used, it was decided to replace Ca(OH)₂ by NaOH as the alkali agent in the final experimental treatment outlined in Figure 2.

For the experimental treatment, the initial alkaline pH adjustments (7.0-9.5) of SW were complemented by an acid addition to the SF₁ to bring its pH to pH 1.5 and to observe its effect on the proximal composition, BOD₅ and COD levels and % transmittance. The compositional characteristic of SF₂ is shown in Table 4. Complementing the alkaline pH adjustment of SW with the acidic adjustment of SF₁ results in effluents (SF₂) with a transmittance > 65% and decrements >89% for BOD₅ and >83% for COD with respect to the untreated SW. The COD value reported by Guerrero et al., 1998) mentioned elsewhere, represent less than 78% of our results for SF₂. On the other hand, and similar to our results, reductions from 70 to 80% in the COD levels of the SW generated by a fishmeal plant in Northwestern Mexico using an air flotation system and removals of 78% in BOD₅ levels

from wash water of a fish industry in Algeria using ultrafiltration were reported (Mameri et al., 1996; Miller et al., 2001).

Table 4 shows that the removal of protein and ash in SF₂ were approximately 50% and 36% higher than in SF₁. Results indicated that the complementary pH adjustment in the alkaline zone of CSW followed by the adjustment of SF₁ in the acid one (Figure 2), highly improved the total recovery of organic matter in the IF (IF₂ vs. IF₁) (data not shown), resulting also in a major reduction in BOD₅ and COD levels and increments in % of transmittance for the SF (SF₂ vs. SF₁) (Tables 3 and 4).

Compositional characteristics along with the % of transmittance of SF₂-pH 7.0+1.5 shown in Table 4, indicated that at this stage of the research those experimental conditions constitute the most convenient treatment. However, further work is required for a better improvement of the final effluent composition.

4. Conclusions

The proposed experimental treatment demonstrated its potential for the significant reduction of pollution that could result from the release of untreated SW directly to the marine environment. Although the final effluent (SF₂) did not fulfill the corresponding NOMs, complementary strategies on studies presently under way are being established for improving the process to obtain better effluents and maximize solids recoveries.

Acknowledgement

The authors want to thanks to Productos Pesqueros de Guaymas S.A. de C.V. (PROPEGUAY) for allowing us to use its facilities and supplying the SW required for the study. The authors also want to thanks to M.Sc. Guillermina Garcia-Sanchez and M.Sc. María Elena Lugo-Sanchez for their valuable collaboration and support during the experimental work. The information presented is part of the Ph.D. thesis of the first author.

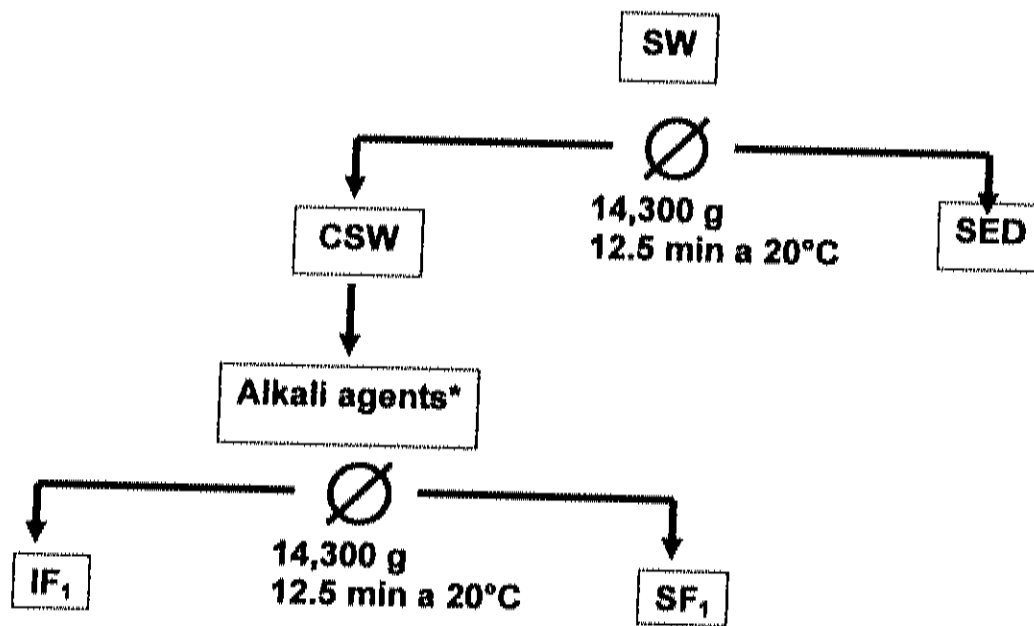
References

- Ahumada, R., Rudolph, A., and Contreras, S., 2004. Evaluation of coastal waters receiving fish processing waste: Lota Bay as a case study: Environmental Monitoring and Assessment. 90, 89-99.
- AOAC, 2000a. Association of Official Analytical Chemist, Method 938.08: Official Methods of Analysis.
- AOAC, 2000b. Association of Official Analytical Chemist, Method 950.46: Official Methods of Analysis.
- Bandarra, N. M., Batista, I., Nunes, M. L., Empis, J. M., and Christie, W. W., 1997. Seasonal Changes in Lipid Composition of Sardine (*Sardina pilchardus*) doi:10.1111/j.1365-2621.1997.tb04364.x: Journal of Food Science. 62, 40-42.
- Bechtel, P. J., 2005. Properties of Stickwater from Fish Processing Byproducts: Journal of Aquatic Food Product Technology. 14, 25-38.
- Castillo, P., Rao, R., and Iluso, J., 1987. Potencial of Acid Activated Clays in the Clarification of Menhaden Stickwater: J. Environ. Sci. Health. 22, 471-489.
- Del Valle, J., and Aguilera, J., 1990. Recovery of Liquid By-products from Fish Meal Factories: A Review: Process Biochemistry, 121-131.
- Del Valle, J., and Aguilera, J., 1991. Physicochemical Characterization of Raw Fish and Stickwater from Fishmeal Production: J. Sci. Food. Agric. 54, 429-441.

- Dirección General de Normas, 2001a. Análisis de Agua. Determinación de la demanda Química de oxígeno en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas: NMX-AA-030-2001. México D. F.
- Dirección General de Normas, 2001b. Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno en Aguas Naturales, Residuales (DBO5) y Residuales Tratadas, NMX-AA-028-2001, México, D. F.
- Guerrero, L., Omil, F., Méndez, R., and Lema, J., 1998. Protein Recovery During the Overall Treatment of Wastewaters from Fish-Meal Factories: *Bioresource Technology*. 63, 221-229.
- Jacobsen, F., and Rammussen, L., 1984. Energy Savings Through Enzymatic Treatment of Stickwater in the Fish Meal Industry: *Process Biochemistry*. 19, 165-169.
- López, R. O., and Lechuga, A. M., 2001. Contaminantes en los cuerpos de agua del sur de Sonora: *Salud Pública de México*. 43, 297-305.
- Mameri, N., Abdessemed, D., Belhocine, D., and Lounici, H., 1996. Treatment of Fishery Washing Water by Ultrafiltration: *J. Chem. Biotechnol.* 67, 169-175.
- Miller, J. D., Huptka, J., Niewiadomski, M., Flores, B. B., and Morse, M., 2001. Advanced Wastewater Treatment for the Fish Processing Industries near Ensenada, Baja California: Project number: W-00-3, 1-28.
- Organización Panamericana de Salud, 2002, Stickwater, <http://www.cepis.org.pe/muwww/fulltext/epa/pcsi/pcscap07.html>.

- Procuraduría Federal de Protección al Medio Ambiente, 1997. Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas residuales en aguas y bienes nacionales: Diario Oficial de la Federación. Enero de 1997.
- Roeckel, M., Aspe, E., and Martí, 1996. Achieving clean Technology in the Fish-meal Industry by Addition of New Process Step: *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 67, 96-104.
- Sathivel, S., Bechtel, P. J., Babbitt, J. K., Prinyawiwatkul, W., and Patterson, M., 2005. Functional, nutritional, and rheological properties of protein powders from arrowtooth flounder and their application in mayonnaise: *Journal of Food Science.* 70, E57-E63.
- Schaffeld, G., Bruzzone, P., Illanes, A., Curotto, M., and Aguirre, C., 1989. Enzymatic Treatment of Stickwater from Fishmeal Industry with the Proteasa from *Curcubita ficifolia*: *Biotechnology Letters.* 11, 521-522.
- Valdez, H. S., 2006. Caracterización Parcial y Tratamiento Enzimático del Agua de Cola Generada por una Industria Reductora de Harina de Pescado en Sonora: PhD thesis, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora, 75 p.

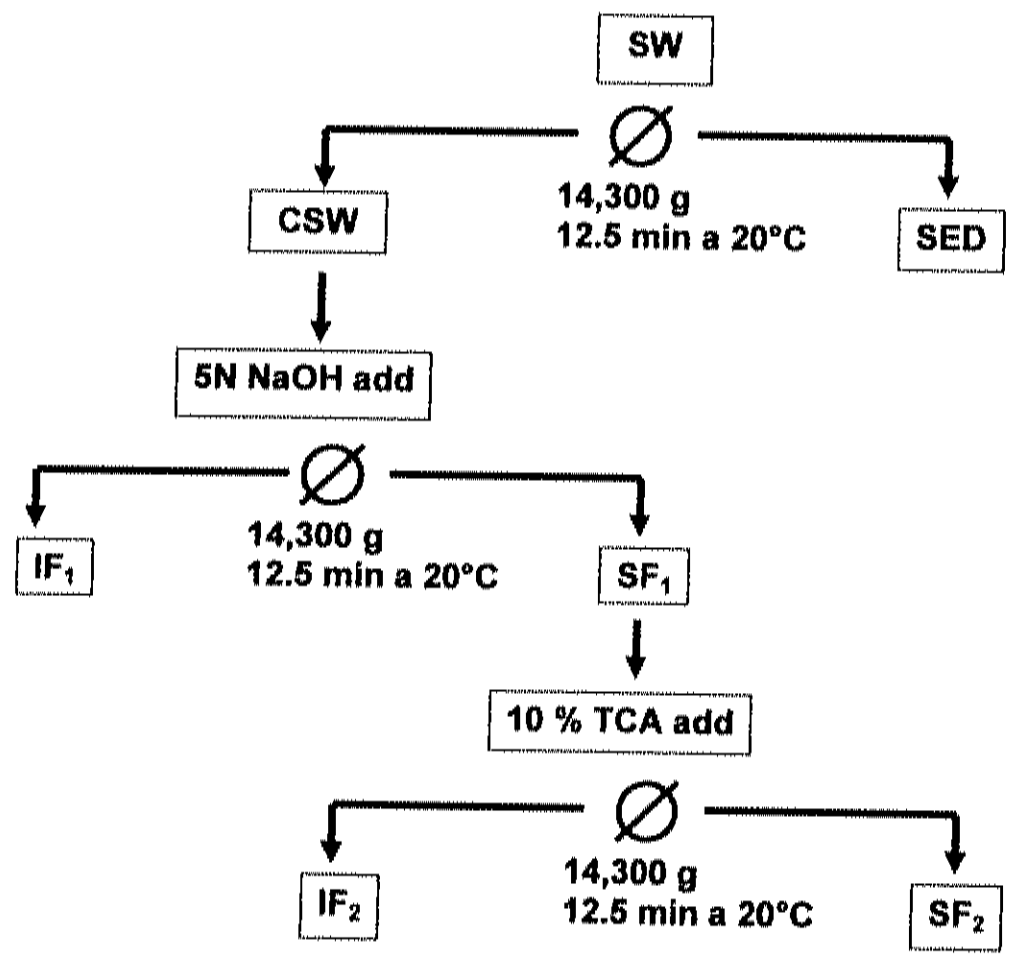
Fig. 1. Flow diagram of the preliminary study to define the experimental alkali treatment.



* 5N Ca(OH)₂, 5N NaOH, 5N Na₂CO₃ or 5% lime

SW: Stick-water. **CSW:** Centrifuged stick-water. **SED:** Sediments. **IF:** Insoluble fraction. **SF:** Soluble fraction. **T:** Transmittance percent

Fig. 2. Flow diagram of the experimental treatment for stick-water.



SW: Stick-water. CSW: Centrifuged stick-water. SED: Sediments. IF: Insoluble fraction. SF: Soluble fraction. T: Transmittance percent. TCA: Trichloroacetic acid

Table1. Chemical composition, BOD and COD of stick-water (SW) and centrifuged stick-water (CSW).

	SW	CSW
pH	5.8 ± 0.3	
% Total solids	9.5 ± 2.7 ^a	5.4 ± 0.7 ^b
% Protein	4.7 ± 1.3 ^a	3.0 ± 0.3 ^b
% Ash	1.7 ± 0.1 ^a	1.4 ± 0.3 ^b
% Lipid	1.8 ± 1.6 ^a	0.1 ± 0.1 ^b
BOD ₅ (mg O ₂ /L.)	48,083 ± 11,106 ^a	24,961 ± 8,051 ^b
COD (mg O ₂ /L.)	152,194 ± 25,110 ^a	82,273 ± 24,267 ^b

Values are the mean ± SD of seven samples (n = 7) taken in different months. Figures in the same row with different superscript are significantly different (p<0.05)

Table 2. Evaluation of different alkali agents for solids removal from CSW
(preliminary studies)

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Alkali agents	NaOH	Ca (OH)₂	Na₂CO₃	Lime
% Solids recovered in IF₁*				
pH 7	0.12	0.37	0.09	0.35
pH 7.5	0.26	0.66	0.24	0.71
pH 8	0.44	0.81	0.29	0.92
pH 8.5	0.45	1.02	0.4	1.17
pH 9	0.45	1.04	0.45	1.07
% protein in IF₁**				
pH 7	44.2	35.2	39.1	36.0
pH 7.5	36.9	36.0	38.8	33.1
pH 8	37.4	34.1	34.4	33.6
pH 8.5	34.1	31.9	33.4	32.8
pH 9	34.6	33.1	33.6	34.1
% Transmittance of SF₁				
pH 7	0.7	2.2	0.5	2.5
pH 7.5	0.8	12.5	0.5	18.7
pH 8	4	30.2	1.1	26.6
pH 8.5	9.6	44.2	2.1	55
pH 9	9.5	18	5.9	30.2

IF= Insoluble fraction, SF= Soluble fraction. * g solids/100 g CSW. ** Dry basis.

Table 3. Relative proximal composition, BOD₅, COD and % transmittance of centrifuged stick-water and soluble fractions from the preliminary alkali treatments.

⋮
⋮
⋮
⋮
⋮
⋮

	Protein (%)	Lipid (%)	Ash (%)	BOD ₅ (mg O ₂ /L)	COD (mg O ₂ /L)	%T
SW	100	100	100	57000	166000	0
CSW	79.7	2.5	91.2	22128	82400	1
SF ₁ -pH 7.0	76.9	nd	85.0	22128	42601	2
SF ₁ -pH 7.5	76.0	nd	86.2	23181	42070	12
SF ₁ -pH 8.0	75.5	nd	82.5	26342	81081	30
SF ₁ -pH 8.5	75.0	nd	72.5	22128	147990	44
SF ₁ -pH 9.0	74.7	nd	88.7	23181	148320	18
SF ₁ -pH 9.5	74.2	nd	85.0	23181	144365	2

**SW: Stick-water. CSW: Centrifuged stick-water. SF: Soluble fraction.
T: Transmittance percent**

Table 4. Relative proximal composition, BOD₅, COD and % transmittance of centrifuged stick-water and soluble fractions from the experimental treatments.

	Protein (%)	Lipid (%)	Ash (%)	BOD₅ (mg O₂/L)	COD (mg O₂/L)	%T
SW	100	100	100	57,433	166,000	0
CSW	72.7	0.98	92.1	17,600	64,646	1
SF ₂ -pH 7.0+1.5	35.9	nd	47.3	3,986	14,700	72
SF ₂ -pH 7.5+1.5	38.0	nd	49.7	6,270	23,324	72
SF ₂ -pH 8.0+1.5	38.0	nd	76.4	6,600	27,676	68
SF ₂ -pH 8.5+1.5	42.3	nd	50.3	4,780	23,710	67
SF ₂ -pH 9.0+1.5	35.9	nd	50.9	5,200	25,656	65.7
SF ₂ -pH 9.5+1.5	35.9	nd	44.8	5,970	23,480	72.3

SW: Stick-water. CSW: Centrifuged stick-water. SF: Soluble fraction.

T: Transmittance percent

Compositional and physicochemical characterization of a final effluent derived from a novel multiple stages treatment of fishmeal stick-water

García-Sifuentes, C, Pacheco-Aguilar, R* and Carvallo-Ruiz, G.

Fish Products Quality Laboratory. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), Carretera a La Victoria km 0.6. P.O. Box 1735. Hermosillo, Sonora, México, Cp 83000. Ph/Fax: +52(662)260-0421

***Corresponding Author.**

Ramon Pacheco-Aguilar, Ph.D.

Email rpacheco@cascabel.ciad.mx

Abstract

Compositional and physicochemical characteristics of a final effluent derived from a novel multiple stages treatment of fishmeal stick-water were evaluated. Treatment basically consisted in complementary centrifugation step followed by pH adjustment (1.5-TCA or 2.5- HCl and 8.5-NaOH) and ultrafiltration (UF). Before the final UF, the TCA-NaOH treatment removed $43.1\pm 15\%$, $99.5\pm 0.5\%$, $81.2\pm 22\%$ and $62.4\pm 12\%$ of protein, fat, BOD₅ and COD respectively. The solid fractions recovered after the acidic and alkaline treatments had a proximate composition of $76.0\pm 4\%$ and 16.9 ± 3.1 of protein, $12.0\pm 6.2\%$ and $2.9\pm 1.9\%$ of fat, $7.9\pm 2\%$ and 75.4 ± 2.6 of ashes respectively. The complementary effect of UF (1kDa MWCO) resulted in an overall 99% reduction of BOD₅ and 90.2% of COD. The results of this study suggest that the proposed strategy could be a technology-wise feasible alternative to deal with the stick-water from fishmeal operations worldwide generating effluents with better compositional characteristic.

Key words: Stickwater, pH adjustment, solids recovering

1. Introduction

Three main liquid by-products effluents are generated during the fishmeal production: bail water, blood water and stick-water (SW). The SW is of foremost importance because the extensive volumes generated, representing about 60% of the processed fish weight with a composition comprising from 6 to 10% of solids (Fernández et al., 2003; Organización Panamericana de Salud, 2002). In practice, these solids are reincorporated into the fishmeal during the drying process, even though they could be recovered and used for human consumption as food ingredients of high nutritional value thus adding more value to this by-product.

SW is a complex system of suspended soluble and insoluble particles, fat globules, dissolved inorganic ions and proteins. Its chemical composition is highly variable and depends of the fish species, storage characteristics and operating plant conditions (Bechtel, 2005; Goycoolea et al., 1997; Guerrero et al., 1998) Nowadays, this effluent is either reprocessed by the fish meal industry, which recovers these solids by using a multiple stages evaporator, thus improving fishmeal yields or is discarded to the sea provoking serious contamination. The former process is not efficient due to the increase in viscosity as evaporation advance, causing operational problems such as plugging of pipes and interruption of fluid pass (Jacobsen, 1985).

Recently, the manufacturing of membranes have been increase and it application depend of the industry needs. Successful applications have been reported in sea water desalination, the sugar and dairy industry, beverages and egg products (Afonso and Borquez, 2002; Daufin et al., 2001; Kimura et

al., 2006). Reviews of applications of cross flow membrane technology in the fishing industry, such as in applications of fish protein recovery had been presented (Afonso et al., 2002). Special membranes of low molecular weight cutoff (LMWCO) are employed in ultrafiltration (UF) and nanofiltration (nF) processes, although their use are not profitable in some cases (Afonso and Borquez, 2002; Fernández et al., 2003). Membrane filtration is an alternative method used by the fish industry for the recovering of solids from effluents. However, if an UF unitary operational step is going to be used by the fishmeal industry to treat SW, a previous treatment is required to avoid problems associated with membrane clogging.

The objective of this research was to evaluate a SW treatment previous to its UF by means of an additional centrifugation and pH adjustments steps to avoid membrane clogging and to generate an effluent with a low contaminant charge.

2. Methods

2.1 Stick-water (SW)

SW was collected directly from the sardine reduction process in a fishmeal plant located in Guaymas, Sonora, Mexico. Samples came from four different seasonal sardine batches captured during the years 2005 and 2006. Each batch from which SW was produced contained a mixture of several pelagic species commonly used by the fish industry to produce fishmeal such as South American pilchard (*Sardinops sagax caerulea*), Californian anchovy (*Engraulis mordax*), Pacific anchovy (*Cetengraulis mysticetus*) and Chub

mackerel (*scomber japonicus*). Samples were taken on 4 L containers, iced on coolers and immediately transported to the laboratory for further analyses

2.2 Treatment

Treatment consisted in a complementary centrifugation as an additional unitary operational step to the traditional process to yield the new so-called centrifuged SW (CSW). Subsequently, this CSW was submitted to pH adjustments and further centrifugations steps and finally ultra-filtrated. The experimental protocol for treatment is outlined in Fig. 1.

Centrifugations were carried out in a centrifuge Beckman model J2-21 at $14,300 \times g/12.5 \text{ min}/20^\circ \text{ C}$. pH adjustments of CSW were carried out by using 40% trichloroacetic acid (TCA) (adjustment to pH 1.5) and 5N HCl (adjustment to pH 2.5). After the acidic adjustment, the CSW was centrifuged (same conditions as mentioned above) to separate the soluble (SF_1) and insoluble (IF_1) fractions. The pH of the collected SF_1 from the acidic treatments was adjusted to 8.5 with 5N NaOH followed by a final centrifugation under the previously mentioned conditions to generate a newly soluble (SF_2) and insoluble (IF_2) fractions.

This final SF was collected and ultra-filtrated through two different UF regenerated cellulose cartridges membranes (PLAC Prep/Scale TFF 6 ft² Unit, 1 kDa MWCO) (Millipore Corporation, Billerica, MA) at 1.2-1.3 bar, cross flow velocity of 20 mL/min, pH 8.5 and 25°C, using a Monostat Preston variable speed peristaltic pump (Barnant Co., Barrington, IL).

2.3 Analytical techniques

A Corning pH meter model 240 was used for all pH measurements. Nitrogen content was carried out by using a Leco FP-528 nitrogen analyzer. Protein content was calculated as percent nitrogen times 6.25; lipids content by goldfisch method (Dirección General de Normas, 2000); moisture, total solids and ash were determinate by the procedures of the AOAC (AOAC, 2000). Biochemical oxygen demand (BOD_5) and the chemical oxygen demand (COD) were carried out according to the Official Mexican Norms applied to industrial effluents (Dirección General de Normas, 2001; Dirección General de Normas, 2001). Dissolved oxygen for both techniques was measured using an oxymeter Thermo Orion model 410 A with a dissolved oxygen electrode Orion 97-08 (Fisher Scientific, Waltham, MA). Total volatile bases (TVB-N) were measure following the method proposed by Woyewoda et al. (1986).

Percent of light transmittance was measure using a spectrophotometer Perkin Elmer Lamda 3B (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA), at 575 nm with distilled water used as a blank (Castillo et al., 1987). The hydrodynamic radius, R_H (size) of SW, CSW and SF obtained from the stick-water treatment was estimated with the dynamic light scattering (DLS) technique (Juarez et al., 2007). Measurements were performed using an ALV-5000 digital correlator system (Langen-GmbH, Germany) fitted with a temperature control set at 25 ± 0.1 °C. The incident light was vertically polarized with a $\lambda_0 = 632$ nm argon laser (30 mW), and the scattered light was measured at 90°. The hydrodynamic radius, R_H , was obtained for diluted

samples through the Stokes-Einstein relation $D_0 = k_B T / 6\pi\eta R_H$, where k_B is the Boltzmann constant, T the absolute temperature, η the viscosity of the solvent, and D_0 the diffusion coefficient at infinite dilution. All measurements were conducted in triplicate, each one recorded in a time interval of 30 s and averaged with the software of the instrument (ALV 5000/E/WIN Software)

3. Results and Discussion

The effect of centrifuging was significant ($p < 0.05$) for all compositional parameters (Table 1). Data indicated a high compositional variation among SW samples due to the nature of raw material used in a given run for the production of fishmeal. It is known that fishmeal composition, as well as that of its derived stick-water, varies depending of factors such as fish species and species mixes, season, physiological condition of fish, etc. (Bandarra et al., 1997; Bechtel, 2005; Del Valle and Aguilera, 1991; Sathivel et al., 2005). The detected variation was highly diminished for CSW indicating that centrifugation yields a more uniform effluent compositional-wise regardless of the initial composition of the source. This fact represents a major technological advantage for any additional implemented operational step for SW treatment as well as for the maintenance of the involved processing equipment.

After centrifugation the CSW still contains 60%, 58% and 81% of the initial total solids, protein and ash, respectively, present in the SW, but only 7% of the lipid. Additionally, data for DBO_5 and DQO reflects the significant effect ($p < 0.05$) of centrifugation in the removal of both organic and inorganic

material. Results also indicated that most of the organic material dissolved or suspended in the CSW is protein.

Protein content (dry weight basis) from 70 to 86 % in SW derived from the processing of Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) and salmon (*Oncorhynchus sp*)(Bechtel, 2005; Sathivel et al., 2005) and 65% protein, 23% fat and 16.4% ash from that of menhaden (*Brevortia gunteri*)(Castillo et al., 1987) were reported. Our results were from 10 to 30% lower in protein, 3% in fat, but 3.4% higher in ash. Those differences could be explained in terms of the fish species and the whole-fish to by-product ratio used for fishmeal manufacturing.

Chemical composition of IF₁ and IF₂ (Figure 2) indicated that the former is high in protein (69.7 - 76.7%) and fat (12.1 - 13.9 %), whereas the later high in ash (72.9 – 75.4 %) but low in fat (2.9 – 3.3 %). Due to its high protein content, the solids recovered by acid precipitation could have a high potential for their use as a food ingredient source both nutritional and functional-wise. Further studies are currently underway to evaluate the nutritional value and functionality of both acid and acid-alkali IF (IF₁ and IF₂).

Results showed an unexpected behavior of protein precipitation with regard to the pH of the environment. It is supposed that extreme pH promotes protein solubility instead of its precipitation. This fact could be explained in terms of the high content of ions (cations and anions) present in solution and how they could interact to each other and with the prevalent charged surface of protein at a given pH thus promoting its precipitation (Jenkins and Snoeyink, 1999; Kelleher et al., 2004; Kim et al., 2005;

Tchobanoglous et al., 2003). Likewise, further studies are currently underway to clarify in more detail the observed protein precipitation mechanism.

Table 2 shows the combined effect of treatments in the relative proximal composition and other physicochemical parameters of the effluents. A decrease of 99, 93, and 63% in BOD₅, COD and protein respectively, was achieved after applying 1 kDa MWCO UF with a cellulose membrane. Transmittance data, as another pollution indicator, also indicate the pronounced effect of treatments in the improvement of the effluent clearness. The organic matter that still remained in the final effluent (470 mg O₂/L) was in compliance with levels allowed by the Mexican norm for this type of materials (400 mg O₂/L). Results indicated that chemical treatments by themselves were not sufficient for the removal of enough organic material without the use of UF. Similar to our results, a protein removal from 63 to 82% using a 1 kDa MWCO ceramic membrane was reported for wastewater from a fish meal plant (Afonso and Borquez, 2002). On the other hand, reductions of only 70-80% in COD levels for SW were achieved using an air flotation system (BAF) (Miller et al., 2001).

H_R data (Table 2) shows how the particle sizes in SW decreased as the treatment protocol was applied. Data indicated that the acidic/alkaline treatments, as compared with complementary centrifugation, had a foremost impact in the removal of the bigger sized particles in SW, generating an effluent (SF₂) with a H_R ranging from 0.21 to 0.19. Further treatment of SF₂ through UF improves its particle size composition suggesting a highly soluble

and low M.W. of the protein material in that effluent. The measure of particle size is used to understand and control the removal of the suspended particles in a given fluid material (Rattanakawin, 2005). Our results indicated that H_R is a useful parameter for the design and control strategies of a water treatment process. Our results could also help to define a better criteria for membrane selection in future studies.

A sample of final industrial effluent (wastewater ready to be eliminated to the environment) generated by the collaborating processing plant taken directly from the condenser contained 0.08% of TN and 5 mg N-TVB/100 g sample. Since the process involved (evaporation) does not allow for the presence of protein in that effluent, the results suggested that detected residual BOD_5 of 352 mgO_2/L derived from N-TVB. On the other hand, the experimental final effluent after UF treatment still contains some protein considering the initial load in SW (Table 2). Based on the total nitrogen (TN) content of 0.22% (Table 4) and the non-protein nitrogen (0.12%) observed in this effluent along with the MWCO of the UF membrane (1 kDa), it could be concluded the presence of very low M.W. protein/polypeptides in concentration $\leq 0.625\%$ along with some volatile bases (3.56 mg/100g sample) to give a BOD_5 of 456 mgO_2/L .

4. Conclusions

Significant reduction of chemical components clearly pointed out that the proposed treatment strategy is technically suited to accomplish the aim goals. It was demonstrated its potential to significantly reduce pollution that

could be generated by this effluent if not properly treated. In addition, proximal composition of recovered solids suggests the need of focusing new research for the evaluation of their nutritional and functional properties for further use as food and feed ingredient.

Acknowledgement

The authors wish to thank to Productos Pesqueros de Guaymas S.A. de C.V. (PROPEGUAY) for allowing us the use of its facilities and supplying the SW required for the study. The authors also want to thank to M.Sc. Guillermina Garcia-Sanchez and M.Sc. Maria Elena Lugo-Sanchez for their valuable collaboration and support during the experimental work. The information presented is part of the Ph.D. thesis dissertation of the first author.

References

- Afonso, M.D., Borquez, R., 2002. Nanofiltration of wastewaters from the fish meal industry. *Desalination*, 151, 131-138.
- Afonso, M.D., Borquez, R., 2002. Review of the treatment of seafood processing wastewaters and recovery of proteins therein by membrane separation processes prospects of the ultrafiltration of wastewaters from the fish meal industry. *Desalination*, 142, 29-45.
- Afonso, M.D., Brites Alves, A.M., Mohsen, M., 2002. Crossflow microfiltration of marble processing wastewaters. *Desalination*, 149, 153-62.

- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis. 5th ed. Washington, Association of Official Analytical Chemists.
- Bandarra, N.M., Batista, I., Nunes, M.L., Empis, J.M., Christie, W.W., 1997. Seasonal Changes in Lipid Composition of Sardine (*Sardina pilchardus*). *J. Food Sci*, 62, 40-42.
- Bechtel, P.J., 2005. Properties of Stickwater from fish processing byproduct. *Journal of Agriculture and Food Product Technology*, 14, 25-38.
- Castillo, P., Rao, R., Liuzzo, J., 1987. Potential of acid activated clay in the clarification of menhaden stickwater. *Journal of Environmental Science and Health*, B22, 4, 471-489.
- Daufin, G., Escudier, J.P., Carrère, H., Bérot, S., Fillaudeau, L., Decloux, M., 2001. Review Paper: Recent and Emerging Applications of Membrane Processes in the Food and Dairy Industry. *Food and Bioproducts Processing*, 79, 89-102.
- Del Valle, J.M., Aguilera, J.M., 1991. Physicochemical characterisation of raw fish and stickwater from fish meal production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 54, 429-441.
- Dirección General de Normas, 2000. Análisis de Agua. Determinación de Grasas y Aceites Recuperables en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas NMX-AA-005-SCFI-2000, México, DF.
- Dirección General de Normas, 2001. Análisis de Agua. Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas NMX-AA-028-SCFI, México, DF.

- Dirección General de Normas, 2001. Análisis de Agua. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas NMX-AA-030-SCFI-2001, México, DF.
- Fernández, D., M. D, Montero, P., Gómez, G., M. C, 2003. Effect of freezing fish skins on molecular and rheological properties of extracted gelatin. *Food Hydrocolloids*, 17, 281-286.
- Goycoolea, F., Nieblas, J., Noriega, L., Higuera-Ciajara, I., 1997. Temperature and Concentration Effects on the Flow Behaviour of Stickwater. *Bioresource Technology*, 59, 217-225.
- Guerrero, F.L., Omil, F., Mendez, R., Lema, M., 1998. Protein Recovery During the Overall Treatment of Wastewaters from Fish-Meal Factories. *Bioresource Technology*, 63, 221-229.
- Jacobsen, F., 1985. Effect of Enzymatic Treatment of Stickwater on Evaporator Capacity and Fouling. *Process Biochemistry*, 20, 103-108.
- Jenkins, D., Snoeyink, V.L., 1999. Química del Agua. Quinta reimpresión ed. Editorial Limusa S.A. de C.V., México, D.F.
- Juarez, J., Galaz, J.G., Machi, L., Burboa, M., Gutierrez-Millan, L.E., Goycoolea, F.M., Valdez, M.A., 2007. Interfacial behavior of N-nitrosodiethylamine/bovine serum albumin complexes at the air-water and the chloroform-water interfaces by axisymmetric drop tensiometry. *Journal of Physical Chemistry*, B111, 2727-2735
- Kelleher, S.D., Feng, Y., Hultin, H.O., Livingston, M.B., 2004. Role of Initial Muscle pH on the Solubility of Fish Muscle Proteins in Water. *Journal of Food Biochemistry*, 28, 279-292.

- Kim, Y.S., Yongsawatdigul, J., Park, J.W., Thawornchinsombut, S., 2005. Characteristics of Sarcoplasmic Proteins and their Interaction with Myofibrillar Proteins. *Journal of Food Biochemistry*, 29, 517-532.
- Kimura, K., Yamamura, H., Watanabe, Y., 2006. Irreversible Fouling in MF/UF Membranes Caused by Natural Organic Matters (NOMs) Isolated from Different Origins. *Separation Science and Technology*, 41, 1331 - 1344.
- Miller, J.D., Hupka, J., Niewiadomski M., Flores B., Morse M., 2001. Advanced Wastewater Treatment for the Fish Processing Industries near Ensenada, Baja California, Ensenada, Baja California, pp. 1-28.
- Organización Panamericana de Salud, 2002. Stickwater. <http://www.cepis.org.pe/muwww/fulltext/epa/pcsi/pcscap07.html>.
- Rattanakawin, C., 2005. Aggregate size distributions in sweep flocculation. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 27, 1095-1101.
- Sathivel, S., Bechtel, P.J., Babbitt, J.K., Prinyawiwatkul, W., Patterson, M., 2005. Functional, Nutritional, and Rheological Properties of Protein Powders from Arrowtooth Flounder and their Application in Mayonnaise. *Journal of Food Science*, 70, E57-E63.
- Tchobanoglous, G., Burton, F., Stensel, H., 2003. Chemical Unit Processes. 4th ed Wastewater Engineering. Treatment and Reuse
Mc Graw Hill, New York.

List of tables

Table 1

Stick-water (SW) and centrifuged stick-water (CSW) chemical composition, BOD₅ and COD.

Table 2

Relative proximal composition, BOD₅, COD, % transmittance and hydrodynamic radius of SW and UF and/or chemical treated CSW.

Table 3

Total nitrogen and N-BVT in water from processing plant condenser (evaporator system)

List of figures

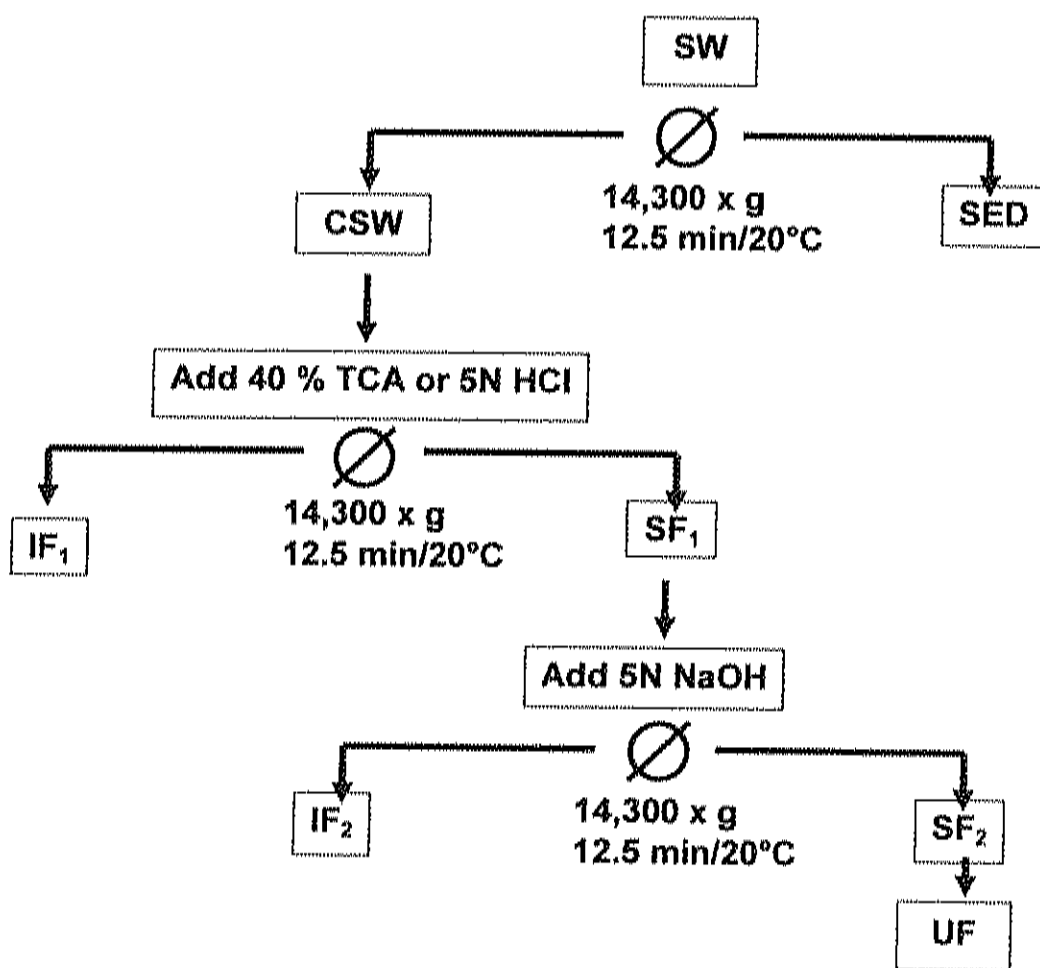
Figure 1

Flow diagram of the stick-water experimental treatment

Figure 2

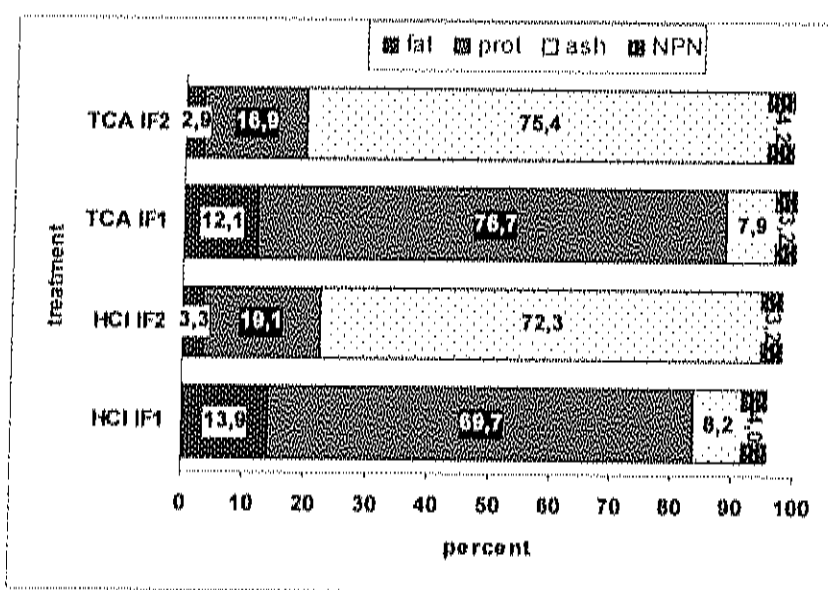
Proximal composition (dry weight) of solids recovered from acid and acid-alkaline precipitation prior to UF.

Figure 1



SW: Stick-water, CSW: Centrifuged stick-water, SED: Sediments, IF: Insoluble fraction, SF: Soluble fraction, TCA: Trichloroacetic acid

Figure 2



Values are means of samples taken in different month (n = 4)

IF: Insoluble fraction. TCA: Trichloroacetic acid. HCl: Hydrochloric acid. NaOH: Sodium hydroxide

Table 1

	SW	CSW
pH	5.8 ± 0.3	n.d.
Total solids (%)	9.2 ± 1.9 ^a	5.5 ± 1 ^b
Protein (%w/w)	5.2 ± 1.6 ^a	3.0 ± 0.3 ^b
Ash (%w/w)	1.6 ± 0.1 ^a	1.3 ± 0.3 ^b
NPN (%w/w)	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1
Fat (%w/w)	1.4 ± 0.6 ^a	0.1 ± 0.1 ^b
BOD ₅ (mg O ₂ /L)	43,510 ± 12,241 ^a	27,000 ± 9,628 ^b
COD (mg O ₂ /L)	146,672 ± 31,144 ^a	85,799 ± 28,108 ^b

n.d. = not determined. NPN: Non proteinic nitrogen

Values are means ± SD for samples taken in different month (n= 7)

Means with the same superscript in each row are equals (p<0.05)

Table 2

Sample	Protein (%)	Ash (%)	Fat (%)	BOD ₅ (mg/LO ₂)	COD (mg/LO ₂)	T (%)	Hr (µm)
SW	100	100	100	43,510 ± 12,241	146,672 ± 31,144	0	2.5
CSW	61 ± 13	79 ± 17	7 ± 4	27,000 ± 9,628	85,799 ± 28,108	0.1	2.1
FS ₂ (HCl treated)	53 ± 13	115 ± 12	2.4	4,934 ± 3,720	39,237 ± 15,361	82.8	0.19
FS ₂ UF (1kDa) (HCl treated)	40 ± 17	111 ± 6	n.d	471	12,037	98.5	0.09
SF ₂ (TCA treated)	57 ± 15	115 ± 12	1.5	5,383 ± 3,467	34,837 ± 9,999	93.3	0.21
SF ₂ UF (1kDa) (TCA treated)	37 ± 21	104 ± 16	n.d	456	10,484	98.1	0.04

Values are means ± SD of for samples taken in different month (n = 4).

SW: Stick-water. CSW: Centrifuged stick-water. SF: Soluble fraction. T: Transmittance percent. Hr: Hydrodynamic radius.

BOD₅: Biochemical oxygen demand; COD= chemical oxygen demand.

Table 3

Sample	TN	N-TVB	BOD₅
Plant sample (water from condenser)	0.08±0.01	5±2	352±45
Experimental sample: TCA (pH 1.5)-NaOH (pH 8.5) + UF 1kDa	0.22	3.6	456

Values are means ± SD of for samples taken in different month (n = 4)

TN= total nitrogen; N-TVB= total volatile bases; BOD₅= Biochemical oxygen demand.

**Properties of recovered solids from stickwater treated by centrifugation
and pH shift**

García-Sifuentes, C*¹, Pacheco-Aguilar, R¹ and Lugo-Sánchez, M.¹ and
García-Sánchez, G.¹

¹ *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD)*

Carretera a La Victoria km 0.6. P.O. Box 1735.

Hermosillo, Sonora, México, Cp 83000. Ph/Fax: +52(662)280-0421

***Correspondent Author.**

Celia O. García-Sifuentes

Email: celia_olivia@estudiantes.ciad.mx

Abstract

The sardine fishmeal process generates pollution and waste with potentially useful protein. In this study sardine stickwater (SW) from fishmeal operation was submitted to a complementary centrifugation step followed by a pH adjustment (acidic + alkaline) to recover solids for their compositional, functional and nutritional properties evaluation. Solid fractions (IF₁ and IF₂) had a chemical composition of 76 ± 4 % and 16.9 ± 3.1 % of protein, 12 ± 6.2 % and 2.9 ± 1.9 % of fat, 7.9 ± 2 % and 75.4 ± 2.6 % of ash, respectively. IF₁ and IF₂ were good sources of Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, P³⁻, K⁺ and essential amino acids. IF₂ was whiter than IF₁ but less color stable over time. Solubility of proteins from IF₁ and IF₂ was higher than that of commercially used materials such as egg albumin and sodium caseinate. IF₁ chemical, nutritional and functional characteristics suggest its potential used as food/feed compositional ingredient.

Key words: Stickwater, pH adjustment, solids recovering

1. Introduction

Only 50 to 60% of the worldwide marine catch is used for human consumption, the rest is not just used as by-product but also eliminated as waste. Nowadays fish by-products are seen as a potential resource of value-added products instead of waste, reason by which there are an increasing interest in this area of research.

Marine by-products contains valuable protein and lipids as well as some vitamins and minerals Fish by-products are mainly used for feed production as fish meal and oil (Hussein & Jordan, 1991; Ockerman & Hansen, 2000; Sandbol, 1993); however its profitability is rather low. Better profits are obtained by making products for industrial use and human consumption such as biopolymers for pharmaceutical and biotechnological, extracting and purifying enzymes and bioactive peptides (Asbjorn, 2004; Rustad, 2003). Stick-water and fish by-products may also serve as a good source of desirable peptide and amino acids to be added as food and feed ingredients to impart desirable technological properties (color, antioxidant, solubility, fat absorption, emulsification stability, etc.)(Sathivel et al., 2003). Protein powders from Alaska pollock by-products (*Theragra chalcogramma*) had been evaluated for their nutritional and rheological properties and proved to be a source that exceeded the adult human requirement for amino acids and an excellent emulsifier and thus to possess a high potential to be used by the food industry (Sathivel & Bechtel, 2006).

At present, research on fish by-products utilization continues extensively with the purpose of finding applications as functional ingredients. The main objective of this study was to elaborate and characterize freeze-dried powders from solids recovered by centrifugation and a pH shift treatment from sardine stick-water.

2. Methods

2.1 Stick-water (SW)

SW was collected directly from the sardine reduction process in a fishmeal plant located in Guaymas, Sonora, Mexico. Samples were obtained from four different seasonal batches in the period from 2005 to 2006 , each of them containing a mixture of several pelagic species commonly used by the fish industry to produce fishmeal such as South American pilchard (*Sardinops sagax caerulea*), Californian anchovy (*Engraulis mordax*), Pacific anchovy (*Cetengraulis mysticetus*) and Chub mackerel (*scomber japonicus*). Samples were taken on 4 L containers, iced on coolers and immediately transported to the laboratory for further analyses

2.2 Treatment

Treatment consisted in a complementary centrifugation as an additional unitary operational step to the traditional process to yield the new so-called

centrifuged SW (CSW). Subsequently, this CSW was submitted to pH adjustments. The experimental protocol for treatment is outlined in Fig. 1.

To recover solids centrifugations were carried out in a centrifuge Beckman model J2-21 at $14,300 \times g/12.5 \text{ min}/20^\circ \text{ C}$. pH adjustments of CSW were carried out by using 40% trichloroacetic acid (TCA) (adjustment to pH 1.5) and 5N HCl (adjustment to pH 2.5). After the acidic adjustment, the CSW was centrifuged (same conditions as mentioned above) to separate the soluble (SF_1) and insoluble (IF_1) fractions. The pH of the collected SF_1 from the acidic treatments was adjusted to 8.5 with 5N NaOH followed by a final centrifugation under the previously mentioned conditions to generate a newly soluble (SF_2) and insoluble (IF_2) fractions. IF_1 and IF_2 were freeze-dried and placed in plastic containers until analyzed.

2.3 Analytical techniques

2.3.1 Proximal composition

Nitrogen content was carried out by using a Leco FP-528 nitrogen analyzer Protein content was calculated as percent nitrogen times 6.25; lipids content by goldfish method (Dirección General de Normas, 2000); ash was determinate following the procedure of the AOAC (AOAC, 2000), while moisture and total solids by the AOAC methodology (AOAC, 2000).

2.3.2. Minerals

Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Zn⁺⁺, Na⁺, K⁺ and P³⁻ quantification was determined for stick-water (SW), centrifuged stick-water (CSW), insoluble fraction-1 (IF₁) and insoluble fraction-2 (IF₂) samples. Samples for analyses were ashed overnight at 550°C. Ashes were digested overnight in an aqueous solution containing 10% (v/v) hydrochloric acid and 10% (v/v) nitric acid in a MARS Xpress digester system (CEM Corporation, Matthews, NC). Digested solutions were diluted as needed and analyzed for above mentioned ions by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP–OES) on a Perkin Elmer Optima 2100 DV (PerkinElmer, Inc. Alle Rechte vorbehalten) connected to auto sampler AS-93

2.3.3. Amino acid analysis

The amino acid analysis was carried on freeze-dried samples. All samples were hydrolyzed with 6N HCl at 150°C for 6 h in vacuum tubes. Samples were evaporated under vacuum at 65°C and suspended with 2 mL of 0.2 N sodium citrate buffer (pH 2.2). The amino acids were quantified using a Hewlett Packard Model GMBH HPLC system with a fluorescence detector (Hewlett-Packard Co., Waldbron, Germany). Precolumn derivatization method was used (Lindroth & Mopper, 1979; Vázquez, Morón & González, 2004). An aliquot of 200 µL of the diluted sample (1:10) was taken + 200 µL of internal standard (L-α-amino n-butiric acid) and 600 µL of water. From the last solution 250 µL was filtered through a 22 µm aqueous filter followed by the addition of 250 µL of OPA (O-Phthaldialdehyde) [(10 mg de OPA + 250 µL de methanol + 37.5 µL of 35 Brij solution + 25 µL de β-mercaptoethanol. Then borate potassium buffer (pH 10.4) was added to reach 10 mL]. Exactly two min after mixing the sample was

manually injected on to the column of the HPLC system with a 20 μL loop (Varian, Inc., Palo Alto, CA). The amino acid separation was carried out in a reverse phase column 10 cm x 4.6 mm ID, C₁₈, 3 μm particle size, 100 \AA (Varian, Inc., Palo Alto, CA) connected to a pre-column (3 cm x 4.6 mm ID) packaged with the same material. Mobile phase (A) was prepared with 100% methanol and (B) was 10% methanol, 90% sodium acetate buffer (pH 7.3). Peak areas produced by amino acid fluorescence were registered in a Chem Station (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA) software. The identification of amino acids was done by using a retention time comparison with standards. Tryptophan and cystein content were not determined.

2.3.4 Free Amino acids content

Free amino acids were quantified in SW, CSW and SF₂. Sample was mixed in TCA, followed by a centrifugation at 10,000 X g/15 min. The supernatant was used for amino acids quantification. Amino acids derivatization and quantification were carried out by the conditions described for amino acid content (Lindroth et al., 1979; Vázquez, Caire, Higuera-Ciapara & Hernandez, 1995).

2.3.5 Total collagen content

The collagen was determined in SW, CSW and IF₁ and IF₂ by reverse-phase chromatography coupled to a NBD-Cl fluorometric detector for the quantification of proline and hydroxyproline. The sample was hydrolyzed with HCl 6 M in a vacuum hydrolysis tube at 150 (± 5) $^{\circ}\text{C}$ for 6 h in a vacuum reaction system. Samples were evaporated under vacuum at 65 (± 1) $^{\circ}\text{C}$ and suspended with 2.0 mL 0.2N sodium citrate buffer (pH 2.2). A 250 μL aliquot of hydrolyzed simple was diluted to 1.0 mL with 0.4 M borate buffer (pH 10.4). 250 μL of the dilution was mixed with 250 μL of NBD-Cl (7-chloro-4-nitro-benzo-2-oxa-1,3-diazol, C₆H₂ClN₃O₃) solution (2.0 mg/mL in methanol) and heated for 5 min at

60 (± 1)°C in a closed screw capped vial. The reaction was stopped by adding 50 μ L of HCl 1M and cooled immediately at 0°C for 30 min and 20 μ L injected into the column. Proline and hydroxyproline separation was carried out in a reverse phase column 10 cm x 4.6 mm ID, C-18, 3 μ m particle size, 100 Å (Varian, Inc., Palo Alto, CA), connected to a precolumn (3 cm x 4.6 mm ID) packaged with the same material. Mobile phase (A) was methanol HPLC grade. Peak areas from proline and hydroxyproline fluorescence were registered in a Chem Station (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA) software. Identification and quantification were using retention time comparison with external standards (Vázquez et al., 2004). Total collagen content (mg/g) was determined by multiplying the hydroxyproline content by 7.25 (Vázquez et al., 2004).

2.3.6. *Electrophoretic profile*

A sodium dodecyl-sulphate (SDS-PAGE) 12% polyacrylamide gel system was used (Laemmli, 1970). Discontinuous 0.75 mm gels were prepared. 60 and 5 μ g of protein and standard (broad range standard Bio-Rad-161-0317) respectively, were injected. Electrophoresis assays were carried out in a Bio-Rad Power Pao 3000 (Bio-Rad Lab., Hercules CA), using 15 mA per gel. Proteins were visualized with coomassie blue staining.

2.3.7. *Color*

Color was measured in SW, CSW, IF₁ and IF₂. Measurement was carried out on freeze-dried samples. Color samples was determined using a Minolta Chromameter Konica Minolta CR-400 (Konica Minolta Sensing, Inc., Japan) and reported as "L", "a" and "b" values. "L" describes the lightness of the sample, "a"

intensity in red ($a > 0$), and "b" intensity in yellow ($b > 0$). Whiteness and hue angle (Θ) were calculated according to the following formulas:

$$\Theta = \text{Archtang } (b/a)$$

$$\text{Whiteness } 100 - [(100-L)^2 + a^2 + b^2]^{1/2}$$

2.3.8 Whiteness stability

It was carried out on SW, CSW, IF₁ and IF₂ freeze-dried samples over a period of four months at 25°C. Samples were storage in closed plastic containers in dark conditions. Whiteness was calculated according to the formula previously mentioned.

2.3.9 Solubility

The solubility of freeze-dried samples were carried out at different pH (Morr et al., 1985). A 10 mg of sample was dispersed in 10 mL of 1M NaCl at 25°C and different pH values (3,5,7,9,11) adjusted with NaOH or HCl. The suspensions was stirred for 1 h and centrifuged at 2,560 x g for 30 min. The supernatant was used to quantify total nitrogen by using a Leco FP-528 nitrogen analyzer (Leco Corp., Saint Joseph, MI) (Gbogouri, Linder, Fanni & Parmentier, 2004; Sathivel et al., 2006). Solubility percent in each simple was calculated as:

$$\% \text{ Solubility} = \frac{\text{Supernatant nitrogen content}}{\text{Total nitrogen content}} \times 100$$

2.3.10 Emulsifying capacity (EC)

EC was measured by the oil titration method (Webb, Ivey, Craig, Jones & Monroe, 1970) modified by (Sathivel et al., 2006). SW, CSW, IF₁ and IF₂ samples (200 mg) were dissolved in 20 mL of 0.1 M NaCl solution. An homogenizer ultra turrax model T-25 basic (Ika Works, Inc., Wilmington, NC) with a disposable 9.5 mm tube was immersed in the solution sample. A separator funnel filled with 100% pure soybean oil (Purela, Escuintla, Guatemala) was placed above the beaker. An electrode connected to a multimeter (YSI 556 MPS, Multi Probe System; Yellow Springs, OH), was immersed in the solution to measure the electrical resistance (ohms) of the emulsion at 25°C. The solution was first stirred at 60% output to make a homogenized solution and get a constant resistance reading. The ohmmeter output was then increased to 100% and the oil was immediately dispensed from the separator funnel into the beaker with a 0.5 mLs⁻¹ flux, generating oil-in-water (O/W) emulsion. A sudden increase in resistance was observed when the oil capacity of the sample emulsion reached a maximum value and the emulsion collapsed to form water-in-oil (W/O) emulsion. At that point, oil delivery was stopped and the oil volume measured. EC values were expressed as mL of emulsified oil per 200 mg of protein.

2.3.11 Emulsifying stability (ES)

ES was evaluated by the oil addition technique (Yatsumatsu, Sawada & Moritaka, 1972) modified by (Sathivel et al., 2006). A 500 mg of sample was transferred into a 250 mL beaker and dissolved in 50 mL of 0.1 M NaCl, and then 50 mL of soybean oil (Purela, Escuintla, Guatemala) was added. The homogenizer was immersed into the mixture and operated for 2 min at 100% output to make an emulsion. From the emulsion, three 25 mL aliquots were immediately taken and transferred into three 25 mL graduated cylinders. The emulsions were allowed to stand for 15 min at 25°C and then the aqueous volume was read. ES (%) was calculated as $[(\text{total volume} - \text{aqueous volume})/\text{total volume}] * 100$.

2.3.12 *In vitro* Digestibility

Apparent protein digestibility was carried out by the multienzyme technique (Hsu, Vavak, Satterlee & Miller, 1977), with modifications (Saterlee, Marshall & Tennyson, 1979). An aliquot of 6.25 mg/mL of protein (sample) was hydrated in 10 mL of water in a digestibility tube. The temperature of the mixture was equilibrated at 37°C. After that 1 mL of enzymes solution (1.6 mg/mL of trypsin, 3.1 mg/mL of chymotripsin and 1.3 mg/mL of peptidase) was added to the sample and with stirred thoroughly. At exactly 10 min from the time the enzymes solution was added, 1 mL of a bacterial protease (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) solution (7.95 mg enzyme/mL) was also added and the

temperature increased to 55°C. After 9 min temperature was brought back to 37°C. At exactly 10 min after the sample had received the bacterial protease (1 min back into the 37°C water bath), the pH of the hydrolisate sample was measured and recorded; continuously for 20 min pH. In vitro protein digestibility of the sample was the calculated using the following equation:

$$\% \text{ Digestibility} = 234.84 - 22.56 (X)$$

Where: X is the pH at 20 min of reaction

Sodium caseinate and egg albumin were used as controls.

3. Results and Discussion

3.1 Proximal composition

Chemical composition of insoluble fractions 1 (IF₁) and 2 (IF₂) are shown in Figure 2. The acid fractions (IF₁) had up to 50% more protein and 10% more fat than the alkali ones (IF₂) but 68% less ash. The IF₂ fraction had higher ash content because of the added NaOH to raise pH and recover protein. Due to its content of up to 70% of protein, the solids recovered by acid precipitation could have a high potential as a food ingredient source. In addition, for each 100 g of SW, solids recovered from the HCl (pH 2.5)/NaOH (pH 8.5) treatment were 1.9 ± 0.63 and 1.4 ± 0.2 g with a moisture of 74 ± 2.7 and 78.2 ± 0.8 % for IF₁ and IF₂, respectively, while for TCA (pH 1.5)/NaOH (pH 8.5) treatment were 2.3 ± 1 and

1.2 ± 0.2 g of solids with a moisture of 75 ± 3 and 79 ± 0.8 % for IF₁ and IF₂, respectively.

The fishmeal composition, as well as that of the derived stick-water, varies depending of factors such as fish species and species mixes, season, physiological condition of fish, etc. (Bandarra, Batista, Nunes, Empis & Christie, 1997; Bechtel, 2005; Del Valle & Aguilera, 1991; Sathivel, Bechtel, Babbitt, Prinyawiwatkul & Patterson, 2005a). Protein content ranging from 70 to 86 % (d.w.) for SW derived from the processing of Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) and salmon (*Oncorhynchus sp*) was reported (Bechtel, 2005; Sathivel et al., 2005a); also, a composition (d.w.) of 65% protein, 23% fat and 16.4% ash for menhaden (*Brevortia gunteri*) SW were reported (Castillo, Rao & Liuzzo, 1987).

3.2 Minerals content

One of main fishmeal chemical characteristics is its mineral content which can vary depending on the bone extraction during the process. The more common macro-elements found are Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ and P³⁻. For shrimp aquaculture feed the maximum Ca⁺⁺ content of meal must be 2.3%, whereas that for P³⁻ around 0.6 % (Martinez, 1999; Sandbol, 1993). Table 1 shows the relative mineral composition. The major minerals were Mg⁺⁺, K⁺, Na⁺ and P³⁻. Similar results were reported for Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) stick-water

(Bechtel, 2005) and protein powders from different fish species (Sathivel et al., 2006).

IF₁ presented a remarkably lower mineral composition than IF₂; nevertheless, its Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ and P³⁻ contents are enough for the requirements of some fish species (salmon, carp, herring and catfish) (Sathivel et al., 2005a). For IF₂ with 70% more ash than IF₁, the major minerals were P³⁻ and Mg²⁺, exceeding both the nutritional requirements for the above mentioned species (Comitee of Animal Nutrition, 1993). A matter balance applied for minerals indicated 97, 77 and 54% recovery for Mg⁺⁺, Ca⁺⁺ and P³⁻ respectively from their initial content in SW. The recovery of minerals indicates their promoted precipitation under the pH shift experimental conditions. Evidence of minerals precipitation at alkaline pH has been reported (Jenkins & Snoeyink, 1999; Tchobanoglous, Burton & Stensel, 2003).

3.3 Amino acid content

Table 2 shows the amino acid content of SW, CSW, TCA-IF₁ and HCl-IF₁. As shown, all samples had similar amino acid profile. High content of aspartic and glutamic acids, histidine, arginine and proline were found; similar composition were reported in different seafood by-products (Sathivel et al., 2006; Sathivel, Bechtel, Babbitt, Prinyawiwatkul, Negulescu & Reppond, 2004; Sathivel et al., 2003; Sathivel et al., 2005a; Sathivel, Smiley, Prinyawiwatkul & Bechtel, 2005b). Essential amino acid content for all samples were higher than

recommended values for human adults (Albert, 1991); high levels of lysine and leucine were found suggesting the potential of the recovered IF₁ and IF₂ as a nutritional food ingredient. Our results confirmed the evidence valid for more than 50 years about the usefulness of fish by-products in the formulation of animal feed (Hulan & Proudfoot, 1987; Lassen & Bacon, 1946; Lassen, Bacon & Dunn, 1949; Lassen, Bacon & Dunn, 1951; Zarkadas, 1986).

3.4 Free amino acids content

Free amino acids in marine products fluctuate among the species. i.e., taurine, proline and alanine are among the major free amino acids in crustaceans. Histidine and taurine are the most abundant amino acids in some species of fish; migratory fish such as tuna and mackerel are high in free histidine. Taurine in fish muscle is probably derived from cysteine. Different genera of the same species may not contain the same amount of taurine. Higher taurine content leads to more active Maillard reaction during fish drying (Sikorski, Kolakoska & Sun, 1990).

Study results shows that the most abundant amino acids were histidine and taurine (Table 3). Similar results were reported for an effluent produced by cooking of jumbo squid (*dosidicus gigas*) mantle muscle (Rosas, 2007). Usually seafood contains high levels of taurine and some species histidine. Taurine has been considered as a possible beneficial component in functional foods (Elvevoll, 2007). Additionally, have been reported that free amino acids

(glutamic acid, serine, glycine, arginine, leucine and lysine) and peptides are the major contributors to the taste of seafoods (Metusalach, Brown & Shahidi, 2000; Ocaño-Higuera, 2003). Thus, due to SW contains 36% of flavour related compounds; this one, per se could be a potential source as an alternative food taste agent. Additionally the total SF₂, SW and CSW free amino acids content could be as a recovered potential source of free amino acids, i.e. Guaymas, Sonora, México, produced around 120,000 ton of SW by work season, considering the total free amino acids content, probably could be recover around 15% of it (more less 18,000 ton).

3.5 Collagen content

Proline (Pro) and hydroxyproline (HPro) was measured to visualize the presence of gelatin from connective tissue degradation. The HPro content was used for calculating the collagen content in gelatin by using the 7.25 factor recommended by Vázquez-Ortiz, (2004). The content of HPro and Pro (% w/w) were similar to those reported by Sathivel and Bechtel (2005) (1.6 - 2.3 g/100 g) in flour from fish wastes. Sathivel and Bechtel (2006) also reported values of HPro and Pro (mg/g of protein) from skeletons, heads, viscera and mixtures of cod and Alaska pollock wastes similar to ours. HPro levels found SW is indicative of the connective tissue being transformed into gelatin by the thermal process involved. The presence of HPro in IF₁ indicates that gelatin is precipitated along with other proteins.

Considering that SW contains 54.8 % of proteins (dry weigh), the results indicate that 20.6% of this content was collagen in its gelatin form. This result was expected because SW came not only from muscle but also from heads, skin, viscera and bone. Values up to 65% of collagen in the protein fraction has been reported in the solid waste derived from the processing of Pacific whiting (*Merlucciuss productus*) into surimi (Kim & Park, 2004). Our results suggest that SW could be a source of collagen for industrial use (food, cosmetics, pharmacy, etc.). However, collagen content in SW depend on the mixture fish/waste composition destined to fishmeal production.

3.6 Electrophoretic profile

SDS-PAGE gel electrophoresis under reduced conditions was used to determine molecular weight (MW) of the major proteins recovered from SW, CSW and IF₁. As shown in Figure 3, SW and CSW showed bands with MW in the range from 37 to 370 kDa. There is high protein/peptide material in the low MW range of the gel, which could indicate some protein degradation. IF₁ showed bands from 300 to 20 to kDa, while IF₂ from 300 to 100 KDa. Results suggest that bands with MW above 150 kDa could be the result of protein covalent aggregation. Bechtel (2005) reported bands of 39, 120 and 198 kDa in pollock/cod stickwater while Sathivel and Bechtel (2006) reported protein patterns of 10, 19, 44, 132 y 205 kDa in Alaska pollock protein powders.

3.7 Color and whiteness

Color is affected by several factors including species, process, particle size, fat content and moisture. Hemoglobin (Hb) and myoglobin (Mb) are the more abundant hemo-proteins in dark muscle and blood. The color tone of fish muscle depends on the Mb/Hb ratio in muscle (Richards & Hultin, 2002; Sohn, Taki, Ushio, Kohata, Shioya & Ohshima, 2005). The experimental L, a, b average values obtained for SW were 47.8 ± 1.5 , 3.1 ± 0.2 and 15.1 ± 1.5 , respectively. After centrifugation (CSW) approximately 99% of fat and 24% of proteins were eliminated from SW yielding average values of L, a and b of 78 ± 1 , 1.7 ± 0.3 and 20.7 ± 0.5 respectively. Color-wise our results are lighter and slightly yellower than those reported by Bechtel (2005) for SW obtained from lean species (L = 70.7, a = 2.0, b = 20.3). Results indicated the relevant impact on color of the complementary centrifuging step proposed, as well as the effect of sample source (fish type and mixtures) on color.

Whiteness index provides a total evaluation of the color. A study of the whiteness stability of SW (solids), CSW (solids), IF₁ and IF₂ was carried out. Significant difference ($p < 0.05$) with respect to the first month was observed in SW and CSW, after this period no changes ($p \geq 0.05$) were detected indicating color stability (Figure 4). With respect to IF₁, color remained stable during the whole storage period, while IF₂ presented instability only during the first month, afterward remained stable. There aren't reports about fishmeal whiteness stability; however, higher taurine content leads to more active Maillard reaction

during fish drying (Sikorski et al., 1990) and IF₂ contains more content of this amino acid than IF₁. No correlation between whiteness and proteins or lipids content was observed. On the whole, IF₂ was 30% whiter than IF₁.

3.8 Solubility

The interest in replacing artificial ingredients by natural ones has been increasing lately. In this way, the use of proteins as functional agents could be very favorable to the food industries. Solubility can be defined as the percent of the total amount of protein contained in the food material that can be extracted by water or salt solution at specified conditions. Protein solubility is a prerequisite step for gelation, emulsification, binding and some other functional processes of the protein (Feng & Hultin, 1997; Kolakoski, 2001; Vieira, Biasutti, Capobianco, Afonso & Silvestre, 2006). Figure 5 shows the solubility results. Protein denaturation during processing can contribute to decrease solubility. Higher solubility in the pH range from 5 to 9 and lower at pH 3 and 11 was observed for the TCA-IF₂ and HCl-IF₂ recovered solids. TCA-IF₁ and HCl-IF₁ presented more solubility in the pH range from 5 to 11. Solubility of proteins from IF₁ and IF₂ was higher than the observed for commercially used materials such as egg albumin, sodium caseinate and soy protein concentrate (Sathivel et al., 2003). A range of protein solubility from 27 to 42 % was reported for white fish by-products (Sathivel et al., 2005a), and from 54 to 69% for Alaska Pollock, salmon and cod (Bechtel, 2005).

pH influences the charge of protein side chains (acid and basic groups); consequently, proteins generally exhibit their minimum solubility in their isoelectric point. Additionally, the salting-in effect can be described as further salt binding by the protein's hydrophilic domain allowing resolubilization by increased protein charge, resulting in a large protein-protein electrostatic repulsion term (Feng et al., 1997; Kolakoski, 2001; Vieira et al., 2006). Low solubility at pH 1 and 4 and high solubility in the pH range from 6 to 12 were found for salmon muscle protein hydrolysates (Kristinsson & Rasco, 2000), also a high solubility at pH up to 6 for salmon by-products hydrolysates were reported (Gbogouri et al., 2004). Our results were similar with those studies.

3.9 Emulsifying capacity (EC), emulsifying stability (ES) and Digestibility

Proteins are the most important biopolymers used as ingredients in food emulsions, since they have the ability to stabilize emulsions. This is of great relevance since many natural and processed foods are either partly or fully emulsions (Vieira et al., 2006). Table 4 shows the EC, ES and *in vitro* digestibility results. CSW by itself contains better EC and ES than controls. Even though TCA-IF₂ and HCl-IF₂ displayed very good EC, they showed low stability conferring use limitations for these fraction. This result may be due to the presence of Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ salts, since minerals cause emulsion instability (Yixing, Russ & Lloyd, 2007). Overall, the TCA IF₁ showed the best emulsifying related properties, even better than those reported in the literature for several

fish materials. EC of 57 and 59% were reported for Arrowtooth flounder protein powders as well as EC and ES from 29 to 34.5 and 65 to 77%, respectively, for protein powders from Alaska pollock by-products (Sathivel et al., 2005a, 2006).

Usually, the digestibility requirements for aquaculture nutrition is up to 85% (Martínez, 1999; Sandbol, 1993). In the present study IF₁ had up 88%. Additionally, the protein and amino acid content of IF₁ suggest its potential use for animal feed. Similar digestibility values were observed for anchovy, deboned white fish and Atlantic menhaden (Ezquerro, Garcia-Carreño, Civera & Haard, 1997) and herring meals (Luzzana, 2001). Values from 5 to 7% higher than those from our study were reported by Bechtel (2005).

4. Conclusions

Results indicate that solids recovered from SW treatment present by themselves extraordinary compositional, nutritional and functional attributes. Due to the mineral, protein (collagen included) and essential amino acids content in IF₁, results suggest its potential use as food and feed functional and nutritional ingredient. Although IF₂ was whiter than IF₁, the better chemical composition and whiteness stability of the latter confers to it remarkable attributes as food/feed ingredient.

Acknowledgement

The authors want to thanks to Productos Pesqueros de Guaymas S.A. de C.V. (PROPEGUAY) for allowing us to use its facilities and supplying the SW required for the study. The authors also want to thanks to M.Sc. Gisela Carvallo-Ruiz for their valuable collaboration and support during the experimental work. The information presented is part of the Ph.D. thesis dissertation of the correspondent author.

References

- Albert, J. L. (1991). Food, Nutrition and Agriculture - 2/3 - Nutrient Requirements Rome: FAO.
- AOAC (2000). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists: Washington.
- Asbjorn, G. (2004). Enzymes and Bioactive Peptides from Fish Waste Related to Fish Silage, Fish Feed and Fish Sauce Production. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 13(2), 3-11.
- Bandarra, N. M., Batista, I., Nunes, M. L., Empis, J. M., & Christie, W. W. (1997). Seasonal Changes in Lipid Composition of Sardine (*Sardina pilchardus*). *J. Food Sci*, 62(1), 40-42.
- Bechtel, P. J. (2005). Properties of Stickwater from fish processing byproduct. *Journal of Agriculture and Food Product Technology*, 14(2), 25-38.

- Castillo, P., Rao, R., & Liuzzo, J. (1987). Potential of acid activated clay in the clarification of menhaden stickwater. *Journal of Environmental Science and Health, B22, 4*, 471-489.
- Comitee of Animal Nutrition (1993). Nutrient requeriments of fish. In: N. R. Council: National Academy Press
- Del Valle, J. M., & Aguilera, J. M. (1991). Physicochemical characterisation of raw fish and stickwater from fish meal production. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 54(3)*, 429-441.
- Dirección General de Normas (2000). Análisis de Agua. Determinación de Grasas y Aceites Recuperables en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas. *NMX-AA-005-SCFI-2000*. México, DF.
- Elvevoll, E. O. (2007). Fish waste and functional foods. In: D. o. M. B. Norwegian College of Fishery Science. Norway: University of Tromsø.
- Ezquerro, J. M., Garcia-Carreño, F. L., Civera, R., & Haard, N. F. (1997). pH-stat method to predict protein digestibility in white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Aquaculture, 157(3)*, 251-262.
- Feng, Y., & Hultin, H. O. (1997). Solubility of the Proteins of Mackerel Light Muscle at Low Ionic Strength. *Journal of Food Biochemistry, 21(1)*, 479-496.
- Gbogouri, G. A., Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2004). Influence of Hydrolysis Degree on the Functional Properties of Salmon Byproducts Hydrolysates. *J. Food Sci, 69(8)*, 615-622.

- Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. D., & Miller, G. A. (1977). A Multienzyme Technique For Estimating Protein Digestibility. *J. Food Sci*, 42(5), 1269-1273.
- Hulan, H. W., & Proudfoot, F. G. (1987). The Effect of Adding White Fish Meal Containing Enzyme Digested or Untreated Stickwater Solids to Diets for Broiler Chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 16, 253-259.
- Hussein, H. S., & Jordan, R. M. (1991). Fish Meal as a Protein Supplement in Ruminant Diets: A review. *Journal of Animal Science*, 69, 2147-2156.
- Jenkins, D., & Snoeyink, V. L. (1999). *Quimica del Agua*. México, D.F.: Editorial Limusa S.A. de C.V. .
- Kim, J. S., & Park, J. W. (2004). Characterization of Acid-soluble Collagen from Pacific Whiting Surimi Processing Byproducts. *J. Food Sci*, 69(8), 637-642.
- Kolakoski, E., ed (2001). *Functional properties of proteins in food systems*. Lancaster, PA, USA: Technomic Publishing Company, Inc.
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Hydrolysis of salmon muscle proteins by an enzyme mixture extracted from atlantic salmon (*Salmo salar*) pyloric caeca. vol. 24 (pp. 177-187).
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lassen, S., & Bacon, E. K. (1946). The use of condensed fish soluble in poultry nutrition. *Poultry Sciences*, 25, 486-491.

- Lassen, S., Bacon, E. K., & Dunn, H., J (1949). The relationship of nutritive value of condensed fish soluble to quality of raw material. *Poultry Sciences*, 28, 134-140.
- Lassen, S., Bacon, E. K., & Dunn, H. J. (1951). Fish reduction process. *Industrial & Engineering Chemistry*, 43, 2082-2087.
- Lindroth, P., & Mopper, K. (1979). High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with O-phthaldialdehyde. *Analytical Chemistry*, 51(11), 1667-1674.
- Luzzana, U. (2001). Recent advances in the development of innovative chemical methods for determining the nutritional value of fish meals and aquafeeds. vol. 32 (pp. 661-670).
- Martinez, C. L. R. (1999). Cultivo de camarones peneidos. Principios y Prácticas. (p. 145); AGT Editor S.A.
- Metusalach, J., Brown, A., & Shahidi, F. (2000). Variation in the Contents of Crude Protein, Total and Free Amino Acids of Artic Charr (*Salvelinus alpinus*) Reared at Different Stocking Densities. *Journal Aquatic Food Product Technology*, 9(3), 39-56.
- Morr, C. V., German, B., Kinsella, J. E., Regenstein, J. M., Buren, J. P. V., Kilara, A., Lewis, B. A., & Mangino, M. E. (1985). A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure. *J. Food Sci*, 50(6), 1715-1718.

- Ocaño-Higuera, V. M. (2003). Efecto de la temperatura sobre la fisiología antemortem y la bioquímica posmortem, calidad y vida de anaquel del músculo abductor en la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*). Tesis de doctorado., *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C* (p. 144). Hermosillo, Sonora México.
- Ockerman, H. W., & Hansen, C. L. (2000). *Animal by-Product Processing and Utilization*. Florida: CRC Press.
- Richards, M. P., & Hultin, H. O. (2002). Contributions of Blood and Blood Components to Lipid Oxidation in Fish Muscle. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 555-564.
- Rosas, R. Z. G. (2007). Caracterización parcial de sólidos solubles presentes en el agua de cocción del músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). vol. Licenciatura (p. 78). Los Mochis, Sinaloa: Instituto Tecnológico de los Mochis.
- Rustad, T. (2003). Utilization of Marine by-Products. *Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry*, 2(4), 458-463.
- Sandbol, P. (1993). Nueva Tecnología en la Producción de Harina de Pescado para Piensos: Implicaciones sobre la Evaluación de la Calidad. In: *IX Curso de Especialización FEDNA*. Barcelona, España.
- Saterlee, L. D., Marshall, H. F., & Tennyson, J. M. (1979). Measuring Protein Quality. *J. American Oil Chemists Soc.*, 56, 103-109.

- Sathivel, S., & Bechtel, P. J. (2006). Properties of soluble protein powders from Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*). *International Journal of Food Science and Technology*, 41(5), 520-529.
- Sathivel, S., Bechtel, P. J., Babbitt, J., Prinyawiwatkul, W., Negulescu, I. I., & Reppond, K. D. (2004). Properties of Protein Powders from Arrowtooth Flounder (*Atheresthes stomias*) and Herring (*Clupea harengus*) byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5040-5046.
- Sathivel, S., Bechtel, P. J., Babbitt, J., Smiley, S., Crapo, C., Reppond, K. D., & Prinyawiwatkul, W. (2003). Biochemical and Functional Properties of Herring (*Clupea harengus*) Byproduct Hydrolysates. *Journal of Food Science*, 68(7), 2196-2200.
- Sathivel, S., Bechtel, P. J., Babbitt, J. K., Prinyawiwatkul, W., & Patterson, M. (2005a). Functional, Nutritional, and Rheological Properties of Protein Powders from Arrowtooth Flounder and their Application in Mayonnaise. *Journal of Food Science*, 70(2), E57-E63.
- Sathivel, S., Smiley, S., Prinyawiwatkul, W., & Bechtel, P. J. (2005b). Functional and Nutritional Properties of Red Salmon (*Oncorhynchus nerka*) Enzymatic Hydrolysates. *Journal of Food Science*, 70(6), c401-c406.
- Sikorski, Z. E., Kolakoska, A., & Sun, P. B. (1990). The nutritive composition of the major groups of marine foods organisms. In: Z. E. Sikorski, *Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation*, vol. 1. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.

- Sohn, J.-H., Taki, Y., Ushio, H., Kohata, T., Shioya, I., & Ohshima, T. (2005). Lipid Oxidations in Ordinary and Dark Muscles of Fish: Influences on Rancid Off-odor Development and Color Darkening of Yellowtail Flesh During Ice Storage. *J. of Food Sci.*, 70(7), s490-s496.
- Tchobanoglous, G., Burton, F., & Stensel, H. (2003). *Chemical Unit Processes. Wastewater Engineering. Treatment and Reuse*. New York: Mc Graw Hill.
- Vázquez, O., F.A, Morón, F., O.E, & González, M., N.F (2004). Hydroxyproline Measurement by HPLC: Improved Method of Total Collagen Determination in Meat Samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 27(17), 2771–2780.
- Vázquez, O. F. A., Caire, G., Higuera-Ciapara, I., & Hernandez, G. (1995). High Performance Liquid Chromatographic Determination of Free Amino acids in Shrimp. *J. Liquid Chromatography*, 18(10), 2059-2068.
- Vieira, C., Blasutti, E., Capobianco, M., Afonso, W., & Silvestre, M. (2006). Effect of salt on the solubility and emulsifying properties of casein and its tryptic hydrolysates. *Ars Pharmaceutica*, 47(3), 281-292.
- Webb, N. B., Ivey, F. J., Craig, H. B., Jones, V. A., & Monroe, R. J. (1970). The Measurement of Emulsifying Capacity by Electrical Resistance. *J. Food Sci.* 35(4), 501-504.

- Yatsumatsu, K., Sawada, K., & Moritaka, S. (1972). Whipping and Emulsifying Properties of Soybean Products. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36, 719-727.
- Yixing, P. Z., Russ, T., & Lloyd, H. (2007). Monitoring and Predicting Emulsion Stability of Metal Working Fluids by Salt Titration and Turbiscan. Finishing Technologies Group, Nalco Company, Naperville, IL.
- Zarkadas, C. G. (1986). The Amino Acid and Mineral Composition of White Fish Meal Containing Enzyme-Digested or Untreated Stickwater Solids. *Animal Feed Science and Technology*, 14, 291-305.

List of tables

Table 1

Relative mineral content of SW, CSW, TCA-FI₁ and TCA-IF₂

Table 2

Amino acid composition of SW, CSW, TCA-FI₁, TCA-IF₂ and HCl-IF₁, HCl-IF₂

Table 3

Free amino acids of SW, CSW and IF₂

Table 4

Functional properties and in vitro digestibility of SW, CSW, TCA-FI₁, TCA-IF₂ and HCl-IF₁, HCl-IF₂

List of figures

Figure 1

Flow diagram of the experimental treatment for stick-water

Figure 2

Proximal composition (dry weight) prior UF of solids recovered by acid and acid-alkaline precipitation

Figure 3

SDS/poliacrylamide gel electrophoresis profiles of SW, CSW, TCA-FI₁, TCA-IF₂ and HCl-IF₁, HCl-IF₂

Figure 4

Whiteness stability of SW, CSW, TCA-FI₁, TCA-IF₂ and HCl-IF₁, HCl-IF₂

Figure 5

Nitrogen solubility of SW, CSW, TCA-FI₁, TCA-IF₂ and HCl-IF₁, HCl-IF₂ at different pH values

Table 1

	SW	CSW	IF ₁	IF ₂
Mg ⁺⁺ (%)	0.4	0.2	0.1	10.4
Ca ⁺⁺ (%)	0.2	0.2	0.04	3.0
P ³⁻ (%)	1.1	1.6	0.9	14.4
K ⁺ (%)	2.8	4.3	0.6	5.3
Na ⁺ (%)	4.3	6.6	1.0	3.7
Zn ⁺⁺ (mg/kg)	40	30	0.6	0.2

SW: Stick-water, CSW: Centrifuged stick-water, IF: Insoluble fraction

Table 2

Amino acids	SW	CSW	TCA IF ₁	TCA IF ₂	HCl IF ₁	HCl IF ₂	EAA
Asp	56.1	40.8	46.5	175.9	53.8	79.7	
Glu	87.4	73.6	75.3	316.9	80.9	234.1	
Ser	18.4	12.7	13	17.6	14.2	17.0	
His*	78.8	52.6	18.3	51.0	15.5	28.1	
Arg	71.9	49.4	25.6	59.9	34.5	39.9	
Gly	19.3	15.1	13.6	17.2	14.1	22.7	
Thr*	52.5	39.6	33.8	47.4	30.1	34.3	9
Taurine	40.0	35.2	2.3	25.9	5.8	14.2	
Ala	50.1	40.0	34.0	48.9	43.0	36.2	
Tyr	10.3	7.0	5.9	8.5	6.7	16.9	
Met*	13.4	11.0	10.0	15.6	10.3	19.3	17
Val*	27.6	19.2	18.2	25.7	21.5	15.6	13
Phe*	17.9	12.5	19.5	22.0	28.9	13.5	
Ile*	18.3	12.7	18.0	24.5	20.0	10.9	13
Leu*	37.6	28.0	40.9	41.6	75.8	32.1	19
Lys*	31.7	41.7	58.8	76.2	115.6	58.9	16
Pro	76.1	60.9	27.3	Nd	20.2		
HyP	28.3	20.6	9.0	nd	6.4		

Data expressed as mg of aminoacid per g protein. Tryptophan and cysteine were not determined. SW: Stick-water. CSW: Centrifuged stick-water. IF: Insoluble fraction. EEA: Essential aminoacid requeriments for adult human

* Essential amino acid

Table 3

Amino acids	SW	CSW	TCA SF₂	TCA SF₂ UF	HCl SF₂	HCl SF₂ UF
Asp	1.9	1.8	2.1	1.6	2.3	1.6
Glu	4.5	4.1	5.4	4.5	5.5	6.6
Ser	1.3	1.1	1.7	1.3	1.4	1.3
His	20.5	23.8	32.8	50.6	31.9	62.0
Arg	2.2	1.9	3.0	2.3	2.7	2.9
Gly	2.1	1.6	2.5	1.4	2.2	2.1
Thr	3.7	2.3	4.9	1.2	4.0	1.8
Taurine	14.9	20.4	25.7	32.8	23.1	42.7
Ala	5.7	5.4	7.8	7.5	7.5	6.0
Tyr	2.2	1.8	2.6	1.5	8.8	2.0
Met	2.2	1.2	2.5	1.1	2.6	2.0
Val	2.7	2.4	3.5	2.6	3.5	2.9
Phe	2.2	1.8	3.1	1.5	2.8	1.8
Ile	2.1	1.6	2.6	1.6	2.6	1.6
Leu	4.2	3.6	5.6	3.6	5.5	4.1
Lys	9.6	7.8	10.9	6.5	9.9	9.9
total	81.9	82.6	116.8	121.9	110.4	151.5

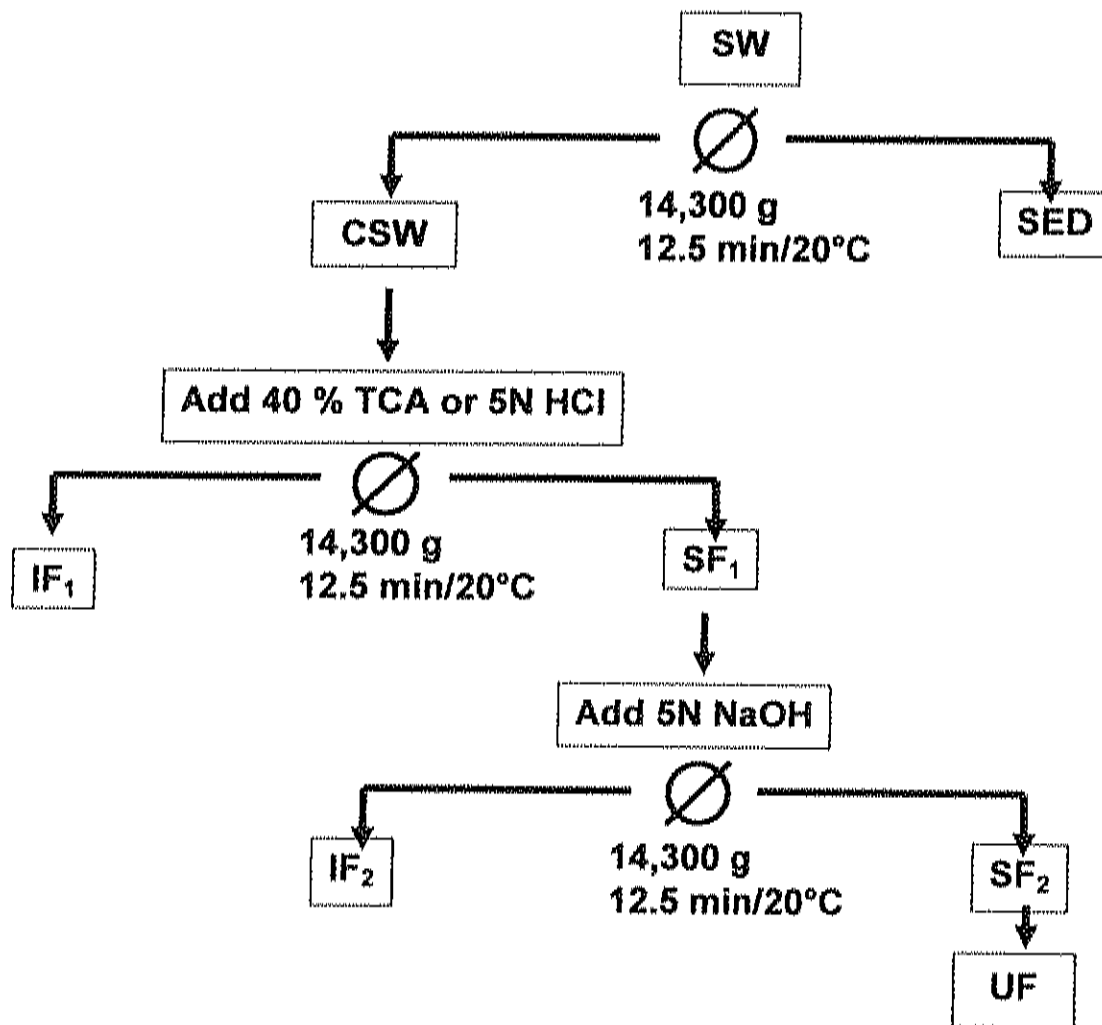
Data expressed as mg of aminoacid per g of sample (dry weigh). Tryptophan and cysteine were not determined. SW: Stick-water, CSW: Centrifuged stick-water, SF: soluble fraction.

Table 4

sample	Digestibility (%)	Emulsifying capacity [mL oil (200 mg) ⁻¹ protein]	Emulsifying stability (%)
SC	91.6 ± 1.6	95.5	100
EA	95.6 ± 1.3	75.8	98
CSW	82.1 ± 0.3	116.5	100
TCA-IF ₁	90.9 ± 2.0	101 ± 10	100 ± 0.5
TCA-IF ₂	71.5 ± 0.6	299 ± 5	62 ± 5
HCl-IF ₁	88.0 ± 2.7	52.4 ± 2	84 ± 4
HCl-IF ₂	72.4	280.7 ± 4	56 ± 3

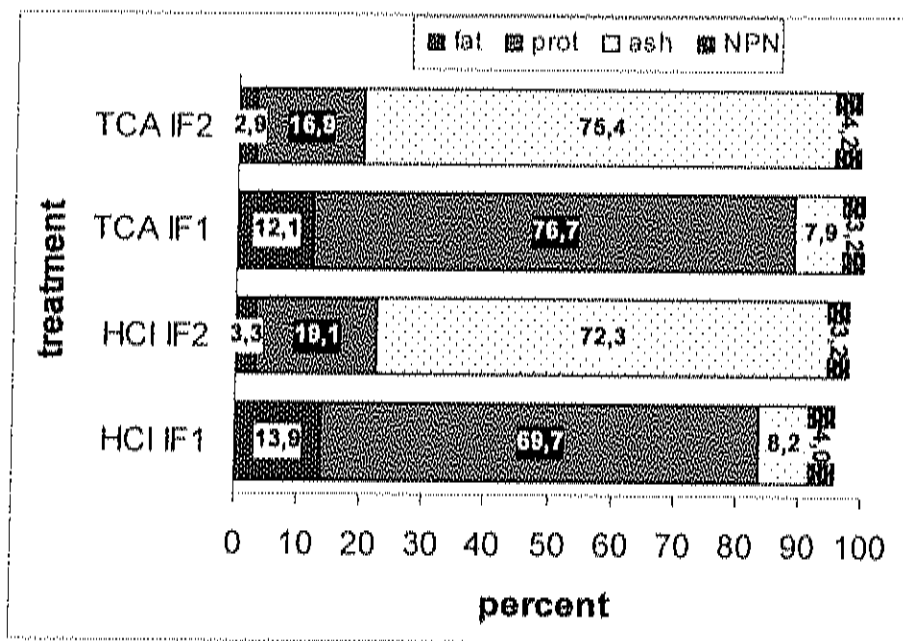
SC: sodium caseinate, EA: Egg albumin, SW: Stick-water, CSW: Centrifuged stick-water, IF: Insoluble fraction.

Figure 1



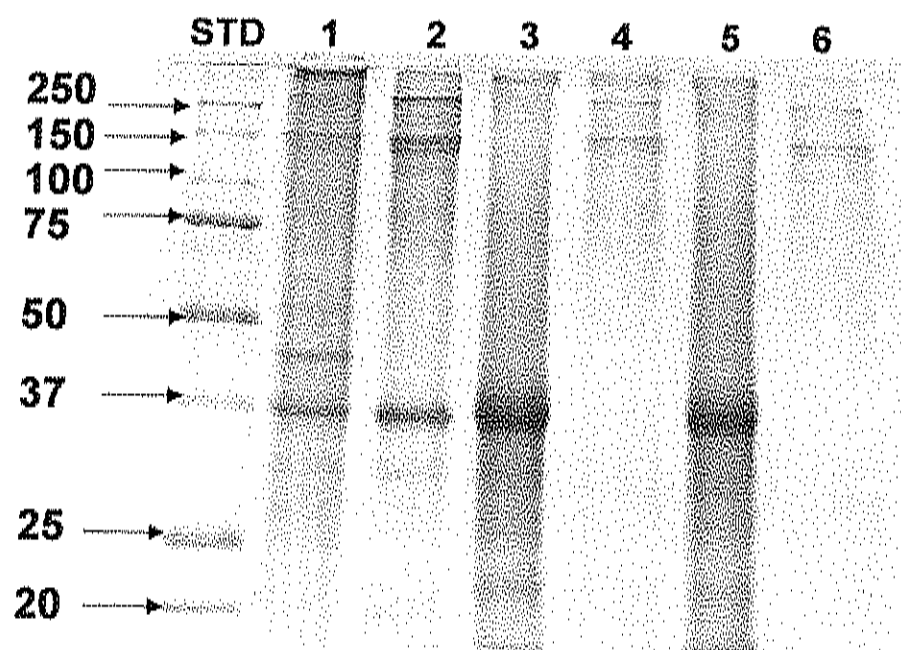
SW: Slick-water. CSW: Centrifuged slick-water. SED: Sediments. IF: Insoluble fraction. SF: Soluble fraction. TCA: Trichloroacetic acid.

Figure 2



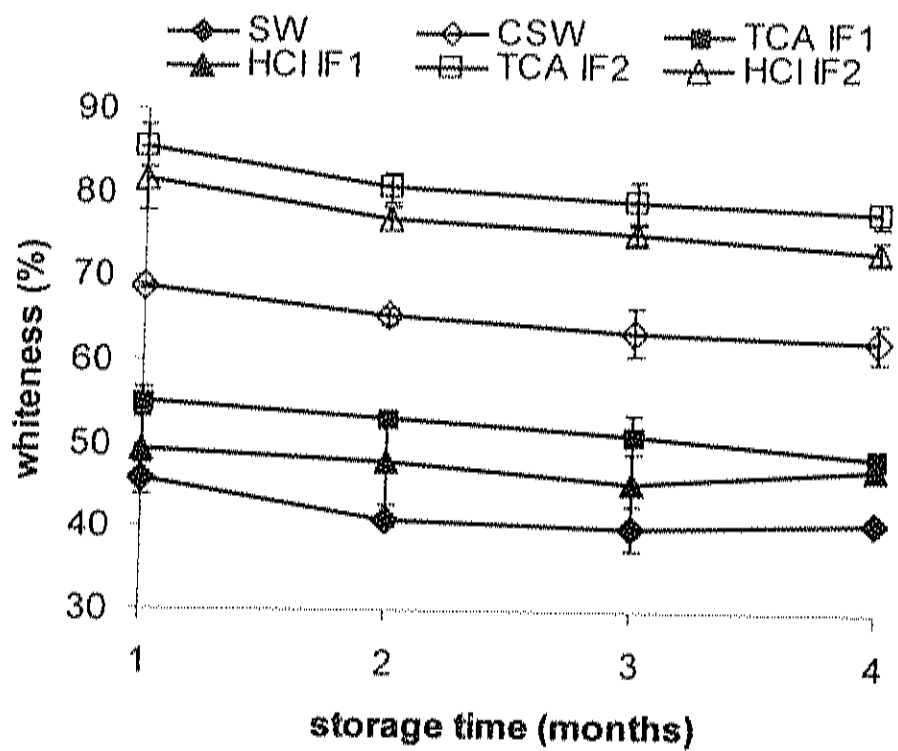
TCA: Trichloroacetic acid. HCl: Hydrochloric acid. NPN: Non proteinic nitrogen. Values are the mean of n = 4.

Figure 4



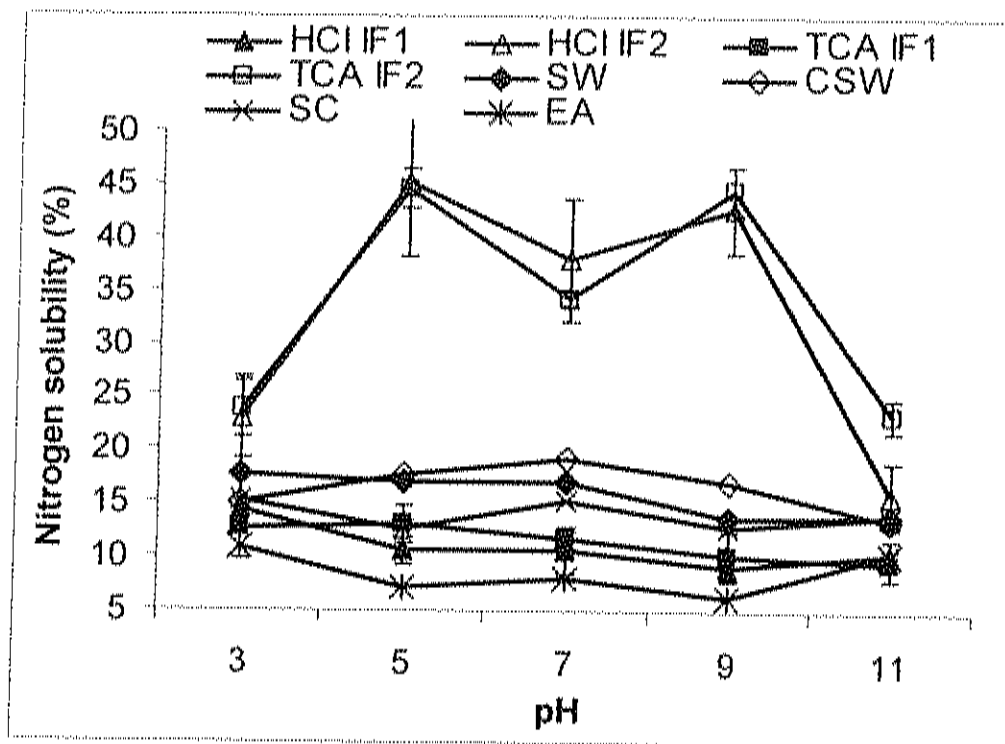
Line 1: SW. Line 2: CSW. Line 3: HCl-IF₁. Line 4: HCl-IF₂. Line 5: TCA IF₁. Line 6: TCA IF₂. See Table 1 for sample abbreviations

Figure 4



SW: Stick-water. CSW: Centrifuged stick-water. IF: Insoluble fraction. Data are the Mean of n = 4.

Figure 5



SW: Stick-water, CSW: Centrifuged stick-water, IF: Insoluble fraction, SC: sodium caseinate, EA: Egg albumin. Data are average of $n = 2$.

VIII.- CONCLUSIONES FINALES

El tratamiento alcalino por si mismo no mostró reducción satisfactoria de los niveles de DBO_5 y DQO.

La combinación del ajuste de pH en ambas zonas (ácida-alcalina) junto con la UF resultó en valores de DBO_5 y pH en el efluente generado en el laboratorio, comparables tanto con la norma como con los resultados obtenidos por medio de evaporación. No así para DQO.

Es de suma el control satisfactorio de la calidad y condiciones del proceso para poder disminuir la presencia de aminoácidos libres y N-BVT que finalmente contribuyen con los niveles de DBO_5 .

El mejor tratamiento fue al utilizar el TCA y NaOH, dicho tratamiento no influyó en las características composicionales, nutricionales y funcionales de los sólidos recuperados. No obstante, desde el punto de vista de la seguridad alimentaria y manejo de reactivos a nivel industrial es más factible la utilización del HCl.

Se evidencia que no hay formación de agregados proteicos derivados del tratamiento propuesto que de alguna pudieran influir en la formación de barreras de taponamiento en las membranas de UF y en la pérdida de funcionalidad.

Queda demostrado el potencial de los sólidos recuperados para ser utilizados en formulaciones para alimentación animal, humana, así como también como ingrediente de valor agregado donde implique la preparación de emulsiones.

BILBIOGRAFÍA

- Afonso, M. D. y Borquez, R. 2002. Nanofiltration of wastewaters from the fish meal industry. *Desalination*. 151: 131-138.
- Ahumada, R., Rudolph, A. y Contreras, S. 2004. Evaluation of coastal waters receiving fish processing waste: Lota Bay as a case study. *Environmental Monitoring and Assessment*. 90: 89-99.
- Almas, K. 1985. Application of Crossflow Membrane Technology in the Fishing Industry. *Desalination*. 53: 167-180.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. 5th ed. Washington. Association of Official Analytical Chemists.
- Asbjorn, G. 2004. Enzymes and Bioactive Peptides from Fish Waste Related to Fish Silage, Fish Feed and Fish Sauce Production. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 13: 3-11.
- Bechtel, P. J. 2005. Properties of Stickwater from fish processing byproduct. *Journal of Agriculture and Food Product Technology*. 14: 25-38.
- Bimbo, A. P., 2002. Pollution prevention and control in the seafood industry and particularly for small and medium sized fishmeal plant
- CEPIS / OPS / OMS. <http://www.bvsde.ops-oms.org/muwww/fulltext/epa/pcsi/pcsi.html>
- Cabrera, C. 1999. Compatibilidad ambiental de la industria de la harina de pescado en Paracas-Pisco. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*. 2.
- Cabrera, C., Carlos,. 2001. Contaminación e impacto ambiental en la bahía de Chancay. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*. 4: 37-46.
- Castillo, P., Rao, R. y Liuzzo, J. 1987. Potential of acid activated clay in the clarification of menhaden stickwater. *Journal of Environmental Science and Health, B22*. 4: 471-489.

- Civit, E. M., Parin, M. y Lupin, H. M. 1982. Recovery of Protein and Oil from Fishery Bloodwater Waste. *Water Research*. 16: 809-814.
- Conapesca, 2005. Producción Pesquera y Acuicola. SAGARPA, México. http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_anuario_estadistico_de_pesca
- Cuadros-Dulanto, M., 1994. Estudio Base para la determinación de límites permisibles en la Industria de Harina y Aceite de pescado, Convenio Ministerio Pesquería-Pesca Perú- Universidad Federico Villareal, Lima, Perú. 30 Pág.
- Del Valle, J. y Aguilera, J. 1990. Recovery of Liquid By-products from Fish Meal Factories: A Review. *Process Biochemistry*. 25: 122-131.
- Del Valle, J. M. y Aguilera, J. M. 1991. Physicochemical characterisation of raw fish and stickwater from fish meal production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 54: 429-441.
- Dirección General de Normas, 2001a. Análisis de Agua. Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas NMX-AA-028-SCFI, México, DF
- Dirección General de Normas, 2001b. Análisis de Agua. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno en Aguas Naturales, Residuales y Residuales Tratadas NMX-AA-030-SCFI-2001, México, DF
- Dirección General de Normas, 2001c. Análisis de Agua. Determinación de Metales por Absorción Atómica en Aguas Naturales, Potables, Residuales y Residuales Tratadas NMX-AA-051-SCFI-2001 México, D.F.
- Dornier, M. y Bennisar, M. 1991. Recovery of Protein in Stickwater from the Manufacture of Fishmeal: Cross-flow Filtration on Inorganic Membranes. *Industries Alimentaires et Agricoles*. 108: 953-960.
- F.A.O. 1986. FAO: Fisheries Technical Paper The production of fish meal and oil. Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

- Fernández, D., M. D, Montero, P. y Gómez, G., M. C. 2003. Effect of freezing fish skins on molecular and rheological properties of extracted gelatin. *Food Hydrocolloids*. 17: 281-286.
- Gbogouri, G. A., Linder, M., Fanni, J. y Parmentier, M. 2004. Influence of Hydrolysis Degree on the Functional Properties of Salmon Byproducts Hydrolysates. *J. Food Sci.* 69: 615-622.
- González, J. F., 1996. Wastewater treatment in the fishery industry. FAO Fisheries technical paper 355. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma
- Goycoolea, F., Nieblas, J., Noriega, L. y Higuera-Clapara, I. 1997. Temperature and Concentration Effects on the Flow Behaviour of Stickwater. *Bioresource Technology*. 59: 217-225.
- Green, J. H., Paskell, S. L. y Goldmintz, D. 1976. Lipolytic Fermentations of Stickwater by *Geotrichum candidum* and *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*. 31: 569-575.
- Guerrero, F. L., Omil, F., Mendez, R. y Lema, M. 1998. Protein Recovery During the Overall Treatment of Wastewaters from Fish-Meal Factories. *Bioresource Technology*. 63: 221-229.
- Guillén, O., Cárcamo, E., Arévalo, W. y Iglesias, S., 1998. Monitoreo e impacto ambiental de la contaminación de la bahía Ferrol Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-08881998000200005
- Hang, Y. D., Woodams, E. E. y Parsons, G. F. 1980. Isolation and Chemical Evaluation of Protein from Clam Wash Water. *J. Food Sci.* 45: 1040-1041.
- Hart, O. y Souires, R. C. 1985. The Role of Membrane Technology in Industrial Water and Wastewater Management. *Desalination*. 56: 69-87.
- Hsu, H. W., Vavak, D. L., Satterlee, L. D. y Miller, G. A. 1977. A Multienzyme Technique For Estimating Protein Digestibility. *J. Food Sci.* 42: 1269-1273.

- Huber technology Inc., 1997. Wastewater Treatment in the Fish Processing Industry. Huber technology Inc., Bodenmais / Germany
- Hussein, H. S. y Jordan, R. M. 1991. Fish Meal as a Protein Supplement in Ruminant Diets: A review. *Journal of Animal Science*. 69: 2147-2156.
- Irlanda-Francis, G. G., 2002. Contaminación de la Bahía de Guaymas. Dirección General de Medio informativo. Universidad de Sonora, Hermosillo, México
- Irlanda, F. G. G., 2002. Contaminación de la Bahía de Guaymas. Dirección General de Medio informativo. Universidad de Sonora, Hermosillo, México
- Jacobsen, F. 1985. Effect of Enzymatic Treatment of Stickwater on Evaporator Capacity and Fouling. *Process Biochemistry*. 20: 103-108.
- Jacobsen, F. y Rasmussen, O. 1984. Energy Savings through Enzymatic Treatment of Stickwater in the Fishmeal Industry. *Process Biochemistry*: 165-169.
- Josepeit, H., 2007. Informe de mercado de la harina de pescado. abril ed. Infopesca, Lima, Perú.
http://www.infopesca.org/rep_men_fish/otros/Mercado_de_harina_de_pescado_Abril_2007.pdf
- Juarez, J., Galaz, J. G., Machi, L., Burboa, M., Gutierrez-Millan, L. E., Goycoolea, F. M. y Valdez, M. A. 2007. Interfacial behavior of N-nitrosodiethylamine/bovine serum albumin complexes at the air-water and the chloroform-water interfaces by axisymmetric drop tensiometry. *Journal of Physical Chemistry*. B111: 2727-2735
- Kameya, A., 2005. Presiones Económicas e Institucionales que Afectan la Biodiversidad Marina en Perú in: Ecología (Ed.). SEMARNAT, Instituto del Mar del Perú <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/286/kameya.html>
- Kim, J. S. y Park, J. W. 2005. Partially Purified Collagen from Refiner Discharge of Pacific Whiting Surimi Processing. *J. Food Sci.* 70: c511-c516.
- Kim, S. K., Kim, Y. T., Byun, H. G., Nam, K. S., Joo, D. S. y Shahidi, F. 2001. Isolation and Characterization of Antioxidative Peptides from Gelatin Hydrolysate of Alaska Pollack Skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 1984-1989.

- Kim, S. K. y Mendis, E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. *Food Research International*. 39: 383-393.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lin, T. M., Park, J. W. y Morrissey, T. M. 1995. Recovered Protein and Reconditioned Water from Surimi Processing Waste. *Journal of Food Science*. 60: 4-9.
- Lindroth, P. y Mopper, K. 1979. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with O-phthaldialdehyde. *Analytical Chemistry*, 51: 1667-1674.
- López-Ríos, O. y Lechuga-Anaya, M. 2001. Contaminantes en los Cuerpos de Agua del Sur de Sonora. *Salud Pública de México*. 43: 289-305.
- López, R. O. y Lechuga, A. M. 2001. Contaminantes en los Cuerpos de Agua del Sur de Sonora. *Salud Pública de México*. 43: 289-305.
- Majluf, P., Barandiarán, A. y Sueiro, J. C., 2007. Evaluación del sector pesquero en Perú. CONAM, Lima, Perú, pp. 127. http://www.conam.gob.pe/documentos/Análisis_ambiental/CEA%20Per%C3%BA%20-%20Evaluaci%C3%B3n%20Ambiental%20del%20Sector%20Pesquero.pdf
- Mérida, J. E., Valdez, R., Díaz, S., Membreño, A., Green, L. y Becker, K., 1997. Caracterización fisicoquímica y ecotoxicológica de nueve efluentes industriales en el distrito central. Centro de Estudios y Control de Contaminantes (CESCO)
- Miller, J. D., Hupka, J., Niewiadomski M., Flores B. y Morse M., 2001. Advanced Wastewater Treatment for the Fish Processing Industries near Ensenada, Baja California, Ensenada, Baja California, pp. 1-28
- Morr, C. V., German, B., Kinsella, J. E., Regenstein, J. M., Buren, J. P. V., Kilara, A., Lewis, B. A. y Mangino, M. E. 1985. A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure. *J. Food Sci.* 50: 1715-1718.

- No, H. K. y Meyers, S. P. 1989a. Crawfish Chitosan as a Coagulant in Recovery of Organic Compounds from Seafood Processing Streams. *J. Agric. Food Chem.* 37: 580-583.
- No, H. K. y Meyers, S. P. 1989b. Recovery of Amino Acids from Seafood Processing Wastewater with a Dual Chitosan-Based Ligand-Exchange System. *Journal of Food Science*, 54: 60-62.
- Ockerman, H. W. y Hansen, C. L. 2000. Animal by-Product Processing and Utilization. CRC Press. Florida.
- Prakash, P. y Sengupta, A. 2003. Selective Recovery from Water Treatment Plant Residuals Using Donnan Membrane Process. *Environ. Sci. Technol.* 37: 4468-4474.
- Roeckel, M., Aspe, E. y Marti, M. C. 1996. Achieving clean Technology in the Fish-meal Industry by Addition of New Process Step. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 67: 96-104.
- Rustad, T. 2003. Utilization of Marine by-Products. *Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry*. 2: 458-463.
- Sandbol, P., 1993. Nueva Tecnología en la Producción de Harina de Pescado para Piensos: Implicaciones sobre la Evaluación de la Calidad IX Curso de Especialización FEDNA, Barcelona, España
- Saterlee, L. D., Marshall, H. F. y Tennyson, J. M. 1979. Measuring Protein Quality. *J. American Oil Chemists Soc.* 56: 103-109.
- Sathivel, S. y Bechtel, P. J. 2006. Properties of soluble protein powders from Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*). *International Journal of Food Science and Technology*. 41: 520-529.
- Sathivel, S., Bechtel, P. J., Babbitt, J., Prinyawiwatkul, W., Negulescu, I. I. y Reppond, K. D. 2004. Properties of Protein Powders from Arrowtooth Flounder (*Atheresthes stomias*) and Herring (*Cuplea harengus*) byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 5040-5046.

- Sathivel, S., Bechtel, P. J., Babbitt, J., Smiley, S., Crapo, C., Reppond, K. D. y Prinyawiwatkul, W. 2003. Biochemical and Functional Properties of Herring (*Clupea harengus*) Byproduct Hydrolysates. *Journal of Food Science*. 68: 2196-2200.
- Sathivel, S., Bechtel, P. J., Babbitt, J. K., Prinyawiwatkul, W. y Patterson, M. 2005. Functional, Nutritional, and Rheological Properties of Protein Powders from Arrowtooth Flounder and their Application in Mayonnaise. *Journal of Food Science*. 70: E57-E63.
- Schaffeld, G., Bruzzone, P., Illanes, A., Curotto, M. y Aguirre, C. 1989. Enzymatic treatment of stickwater from fishmeal industry with the proteases from *Cucurbita ficifolia*. *Biotechnology Letters*. 11: 521-522.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. y Stensel, H. 2003a. Chemical Unit Processes. 4th ed Wastewater Engineering. Treatment and Reuse
Mc Graw Hill. New York.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. y Stensel, H. 2003b. Fundamentals of Biological Treatment. 4th ed Wastewater Engineering. Treatment and Reuse. McGraw Hill. New York.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. y Stensel, H. 2003c. Wastewater Engineering. An overview. 4th ed Wastewater engineering. Treatment and Reuse. Mc Graw Hill. New York. pp. 3-23.
- Toma, R. y Meyers, S. 1975. Isolation and Chemical Evaluation of Protein from Shrimp Cannery Effluent. *J. Agric. Food Chem.* 23: 632-635.
- Vázquez, O., F.A. Morón, F., O.E y González, M., N.F. 2004. Hydroxyproline Measurement by HPLC: Improved Method of Total Collagen Determination in Meat Samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 27: 2771-2780.
- Vázquez, O. F. A., Caire, G., Higuera-Ciapara, I. y Hernandez, G. 1995. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Free Amino acids in Shrimp. *J. Liquid Chromatography*. 18: 2059-2068.

- Webb, N. B., Ivey, F. J., Craig, H. B., Jones, V. A. y Monroe, R. J. 1970. The Measurement of Emulsifying Capacity by Electrical Resistance. *J. Food Sci.* 35: 501-504.
- Welsh y Zall. 1979. Fish Scales: A Coagulating Aid for the Recovery of Food Processing Wastewater Colloids. *Process Biochemistry.* 14: 23.
- Woyewoda, A. D., Shaw, S. J., Ke, P. J. y Burns, B. G., 1986. Recommended laboratory methods for assessment of fish quality. Canadian Technical Report fo Fisheries and Aquatic Sciences. No 1448. Nova Scotia, Canada.
- Wu, T. Y., Mohammad, A. W., Anuar, N. y Rahman, R. A. 2002. Potential use of nanofiltration membrane in treatment of wastewater from fish and surimi industries. *Songklanakarin Journal Science Technology.* 24: 977-987.
- Yatsumatsu, K., Sawada, K. y Moritaka, S. 1972. Whipping and Emulsifying Properties of Soybean Products. *Agricultural ad Biological Chemistry.* 36: 719-727.