



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

**OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS DE
PROTEÍNAS DE VÍSCERAS DE TRUCHA
ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*) CON
PROPIEDADES BIOACTIVAS Y/O
FUNCIONALES**

Priscilla Vásquez Mazo

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Medellín, Colombia

2020



Obtención de hidrolizados de proteínas de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con propiedades bioactivas y/o funcionales

Priscilla Vásquez Mazo

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctora en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Asesor:

José Edgar Zapata Montoya, Ingeniero Químico, MSc, PhD

Línea de Investigación:

Biotecnología

Grupo de Investigación:

Nutrición y Tecnología de Alimentos

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Medellín, Colombia

2020

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la fortaleza para culminar este proyecto con éxito y cumplir otro de mis sueños.

A mi amado Luis, por su paciencia y por estar siempre presente brindándome su amor, apoyo, comprensión y amistad incondicional.

A mi familia que, con su gran amor y su apoyo, han sido una gran motivación en mi vida.

A el Dr. José Edgar Zapata por su compromiso, apoyo, conocimientos compartidos y constante asistencia en la dirección de este proyecto.

A todos los integrantes del Grupo de investigación Nutrición y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Antioquia, por estar siempre dispuestos a ayudarme, por su amistad, solidaridad y compañerismo.

Al comité tutorial, conformado por las Doctoras Silvia Ochoa y Diana Márquez por su disposición y sus valiosas orientaciones.

A la Dra. Valeria Tironi del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), de la Universidad de La Plata (Argentina), por sus enseñanzas y apoyo durante mi pasantía. A todos los compañeros del laboratorio de Proteínas del CIDCA por su ayuda, amabilidad y amor, que hicieron de mi pasantía una experiencia única.

A la Doctoras Adriana Pazos y Verónica Chamorro del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Argentina, por haberme acogido con tanto cariño en su laboratorio, así como la ayuda y las enseñanzas que me brindaron durante mi pasantía. También a todos los integrantes del laboratorio por su apoyo y amabilidad.

A COLCIENCIAS, por la beca doctoral recibida durante el período 2015-2019, para la realización de la presente tesis. Así como a la estrategia de sostenibilidad del Comité para el Desarrollo de la Investigación en la Universidad de Antioquia (CODI) y al Sistema General de Regalías de Colombia, por el apoyo financiero durante este período de formación.

Finalmente, a mis amigos, familiares y compañeros de doctorado, por su apoyo durante todo este proceso.

¡A todos mil gracias!

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del Problema	2
1.2. Objetivos	5
1.2.1. Objetivo General.....	5
1.2.2. Objetivos Específicos.....	5
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	8
2.1.1. Generalidades.....	8
2.1.2. Producción	9
2.2. Subproductos acuícolas	10
2.3. Producción de hidrolizados de proteínas de subproductos acuícolas	12
2.3.1. Hidrólisis enzimática de proteínas	14
2.3.2. Medición de la extensión de la hidrólisis enzimática de proteínas	21
2.3.3. Modelado cinético de la hidrólisis enzimática de proteínas.....	25
2.3.4. Procesos de purificación de hidrolizados enzimáticos de proteínas	30
2.4. Propiedades bioactivas de los hidrolizados de proteínas de subproductos acuícolas	33
2.4.1. Propiedades antioxidantes.....	34
2.4.2. Propiedades antihipertensivas	40
2.4.3. Propiedades anticoagulantes	44
2.5. Bioaccesibilidad de los péptidos bioactivos de los hidrolizados de proteínas de subproductos acuícolas	47
2.5.1. Modelos de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	49
2.5.2. Modelos celulares Caco-2.....	51
2.6. Proteínas funcionales de los hidrolizados de proteínas de subproductos acuícolas	52
2.6.1. Solubilidad de proteínas.....	55
2.6.2. Propiedades emulsionantes	56
2.6.3. Propiedades espumantes	57
3. METODOLOGÍA	60
3.1. Manejo del sustrato.....	61

3.2. Enzimas y reactivos.....	62
3.3. Métodos Analíticos.....	63
3.3.1. Análisis Proximal.....	63
3.3.2. Cuantificación de metales pesados	64
3.3.3. Análisis Microbiológicos.....	64
3.3.4. Determinación de composición de aminoácidos.....	65
3.3.5. Determinación de dipéptidos de Histidina (Anserina y Carnosina).....	65
3.3.6. Determinación de la actividad enzimática	66
3.3.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	67
3.3.8. Cromatografía de exclusión molecular (filtración en gel)	68
3.4. Proceso de Hidrólisis Enzimática	68
3.4.1. Efecto del pH y la temperatura en la actividad proteolítica de la Alcalasa® 2.4L	68
3.4.2. Proceso de hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris.....	70
3.4.3. Determinación del Grado de hidrólisis (GH).....	72
3.4.4. Determinación del número total de enlaces peptídicos (h_{tot})	72
3.4.5. Efecto de la concentración de sustrato, concentración de enzima y temperatura sobre la hidrólisis enzimática de las vísceras de trucha arcoíris.....	73
3.4.6. Efecto de la concentración de grasa y la velocidad de agitación sobre la hidrólisis enzimática de las vísceras de trucha arcoíris.....	75
3.5. Modelado de la cinética de hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	76
3.5.1. Determinación de parámetros cinéticos	78
3.5.2. Modelos cinéticos	80
3.6. Evaluación de Propiedades Bioactivas.....	84
3.6.1. Actividad antioxidante.....	84
3.6.2. Actividad Inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)	87
3.6.3. Actividad anticoagulante	88
3.7. Evaluación de la bioaccesibilidad	89
3.7.1. Simulación de la Digestión Gastrointestinal.....	89
3.7.2. Simulación de la absorción intestinal.....	91
3.8. Fraccionamiento de Hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris.....	93
3.8.1. Fraccionamiento por membranas de ultrafiltración	93
3.8.2. Separación Cromatografía de exclusión molecular (FPLC)	94
3.9. Evaluación de Propiedades Funcionales	95
3.9.1. Solubilidad de proteínas.....	95

3.9.2. Propiedades emulsionantes	95
3.9.3. Propiedades espumantes	96
3.10. Análisis Estadístico	97
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	98
4.1. Caracterización de las vísceras de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) y sus hidrolizados enzimáticos.....	99
4.1.1. Pretratamiento de las vísceras de trucha arcoíris	99
4.1.2. Composición proximal.....	100
4.1.3. Calidad microbiológica.....	101
4.1.4. Contenido de metales pesados	102
4.1.5. Número total de enlaces peptídicos (h_{tot}).....	103
4.2. Optimización de la hidrólisis enzimática de las vísceras de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) con Alcalasa® 2.4L	104
4.2.1. Efecto de pH y temperatura en la actividad proteolítica de la Alcalasa® 2.4L	104
4.2.2. Efecto de la concentración de sustrato, concentración de enzima y temperatura sobre la hidrólisis enzimática de las vísceras de trucha arcoíris.....	107
4.2.3. Efecto de la concentración de grasa y velocidad de agitación sobre la hidrólisis enzimática de las vísceras de trucha arcoíris.....	111
4.3. Caracterización de los hidrolizados enzimáticos de vísceras de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	115
4.3.1. Composición proximal.....	115
4.3.2. Calidad microbiológica.....	116
4.3.3. Contenido de metales pesados	117
4.3.4. Composición de aminoácidos	118
4.3.5. Composición polipeptídica	120
4.4. Modelado cinético de la hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	124
4.4.1. Determinación de parámetros cinéticos	124
4.4.2. Evaluación de modelos cinéticos	131
4.5. Evaluación de la actividad antioxidante de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L (HT)	135
4.5.1. Influencia del GH sobre la actividad antioxidante de los hidrolizados.....	136
4.5.2. Impacto del fraccionamiento de los hidrolizados sobre la actividad antioxidante.....	141
4.6. Evaluación de la actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L (HT).....	145
4.6.1. Influencia del GH sobre la actividad IECA de los hidrolizados	145

4.6.2. Impacto del fraccionamiento sobre la actividad IECA de los hidrolizados	148
4.7. Evaluación de la actividad anticoagulante de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L (HT).....	150
4.7.1. Influencia del GH sobre la actividad anticoagulante de los hidrolizados	150
4.8. Evaluación de la bioaccesibilidad de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L (HT)	153
4.8.1. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> de VT y HT.....	154
4.8.2. Efecto de la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> sobre las propiedades bioactivas de VT y HT	157
4.8.3. Determinación de dipéptidos de Histidina (Carnosina y Anserina).....	161
4.8.4. Fraccionamiento FPLC de VTD y HTD	163
4.8.5. Simulación de la absorción intestinal de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris sobre células Caco-2/TC7.....	165
4.9. Estudio de las propiedades funcionales de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L (HT).....	178
4.9.1. Influencia del GH y el pH sobre la solubilidad de las proteínas de los hidrolizados.....	179
4.9.2. Influencia del GH y el pH sobre las propiedades emulsionantes de los hidrolizados.....	181
4.9.3. Influencia del GH y el pH sobre las propiedades espumantes de los hidrolizados	184
5. CONCLUSIONES	187
6. RECOMENDACIONES	191
7. REFERENCIAS.....	194
8. ANEXOS.....	220
Anexo I. Curvas dosis-respuesta para la actividad ORAC de las fracciones de HT..	221
Anexo II. Curvas dosis-respuesta para la actividad HORAC de las fracciones de HT ...	222

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Composición proximal de subproductos de diversas especies acuícolas	12
Tabla 2.2. Clasificación de Proteasa, de “Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases” por Rao et al., 1998.	18
Tabla 2.3. Tipos de inhibición de de “Lehninger Principles of Biochemistry” por Lehninger et al, 2013.	29
Tabla 2.4. Purificación de hidrolizados de subproductos de pescado con tecnología de membranas.....	31
Tabla 2.5. Técnicas cromatográficas para purificación de hidrolizados de subproductos de pescado	32
Tabla 2.6. Comparación de ensayos basados en HAT y SET, de “Health Effects of Antioxidative and Antihypertensive Peptides from Marine Resources” por Jensen et al, 2013.	38
Tabla 2.7. Actividad Antioxidantes de hidrolizados de proteínas de subproductos de pescado	39
Tabla 2.8. Actividad inhibidora de la ECA de hidrolizados de proteínas de subproductos de pescado	43
Tabla 2.9. Actividad anticoagulante de proteínas marinas.....	47
Tabla 2.10. Ventajas y desventajas de los principales modelos usados para evaluar la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad	49
Tabla 2.11. Propiedades funcionales, mecanismos y su aplicación en alimentos	53
Tabla 2.12. Propiedades funcionales de los hidrolizados de proteínas de subproductos de pescado	54
Tabla 3.1. Variables independientes, sus niveles codificados y reales utilizados en RSM para la optimización la actividad proteolítica de la alcalasa® 2.4L.....	69
Tabla 3.2. Matriz de diseño central compuesto, para evaluar el efecto del pH y temperatura sobre la actividad proteolítica de la alcalasa® 2.4L.....	69
Tabla 3.3. Variables independientes (<i>S</i> , <i>e</i> y <i>T</i>), sus niveles codificados y reales utilizados en RSM para la optimización del GH	73
Tabla 3.4. Matriz de diseño central compuesto, para evaluar el efecto de <i>S</i> , <i>e</i> y <i>T</i> sobre el GH de la hidrólisis enzimática	74
Tabla 3.5. Variables independientes (<i>G</i> y <i>v</i>), sus niveles codificados y reales utilizados en RSM para la optimización del GH	75

Tabla 3.6. Matriz de diseño central compuesto, para evaluar el efecto de G y v sobre el GH de la hidrólisis enzimática	75
Tabla 3.7. Expresiones para los parámetros a y b en función de los mecanismos de reacción, de Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model por Qi & He, 2006. ...	77
Tabla 4.1. Composición proximal de las vísceras de trucha arcoíris	100
Tabla 4.2. Calidad microbiológica de vísceras de trucha arcoíris	101
Tabla 4.3. Contenido de metales pesados en vísceras de trucha arcoíris	103
Tabla 4.4. Niveles de las variables independientes con los valores observados para la variable respuesta, actividad proteolítica (AP).....	104
Tabla 4.5. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable respuesta, actividad proteolítica (AP).	105
Tabla 4.6. Niveles de las variables independientes con los valores observados para la variable respuesta, grado de hidrólisis (GH).	107
Tabla 4.7. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable respuesta, grado de hidrólisis (GH).	108
Tabla 4.8. Niveles de las variables independientes con los valores observados para la variable respuesta, grado de hidrólisis (GH).	112
Tabla 4.9. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable respuesta, grado de hidrólisis (GH).	112
Tabla 4.10. Calidad microbiológica de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris.....	117
Tabla 4.11. Contenido de metales pesados en hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris	118
Tabla 4.12. Composición de aminoácidos de las vísceras de trucha arcoíris (VT), los hidrolizados enzimáticos (HT)	119
Tabla 4.13. Rango de pesos moleculares (MW) correspondientes a los picos presentes en los cromatogramas de la Figura 4.8.	122
Tabla 4.14. Rango de pesos moleculares (MW) correspondientes a los picos presentes en los cromatogramas de la Figura 4.9.	123
Tabla 4.15. Constantes cinéticas para los diferentes mecanismos evaluados	127
Tabla 4.16. Parámetros cinéticos a y b para la hidrólisis de vísceras de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) con diferentes concentraciones iniciales de sustrato y enzima a T = 60 °C y pH = 8,5.....	130
Tabla 4.17. Actividad antioxidante de las fracciones de HT (GH de 20%) obtenidas por ultrafiltración.	142
Tabla 4.18. Composición de aminoácidos libres de la fracción de hidrolizado menor a 3 kDa (HT-F4).....	144

Tabla 4.19. Grado de hidrólisis por el método TNBS, longitud promedio de cadena peptídica (PCL) y proteína (%) de VT, HT y sus digeridos.....	155
Tabla 4.20. Rango de pesos moleculares (kDa) correspondientes a los picos presentes en los cromatogramas de la Figura 4.28.	156
Tabla 4.21. Rango de pesos moleculares (kDa) correspondientes a los picos presentes en los cromatogramas de la Figura 4.29.	157
Tabla 4.22. Efecto de las fracciones sobre la citotoxicidad de las células Caco-2/TC7 según lo evaluado por el ensayo LDH	167

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), de “A Trout’s Anatomy”, por Hiff, 2012.	8
Figura 2.2. Producción mundial de trucha arcoíris.	9
Figura 2.3. Producción acuícola mundial.	11
Figura 2.4. Hidrólisis enzimática de un enlace peptídico.	14
Figura 2.5. Reacción entre un aminoácido y formaldehído en presencia de hidróxido de sodio.	23
Figura 2.6. Reacción de TNBS con grupos amino.	24
Figura 2.7. Reacción de OPA con grupos amino.	24
Figura 2.8. Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten (Curva de Saturación).	28
Figura 2.9. Esquema de los mecanismos químicos y físicos de los péptidos antioxidantes para inhibir los procesos oxidativos. (1) quelación de metales; (2) captación de radicales; (3) interacción física (blindaje; repulsión), de “Antioxidant peptides” por Xiong, 2010.	36
Figura 2.10. Mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)	37
Figura 2.11. Mecanismo transferencia de electrones (SET).....	37
Figura 2.12. Sistema renina-angiotensina y péptidos antihipertensivos derivados de pescado, Tomado y modificado de “Bioactive Peptide of Marine Origin for the Prevention and Treatment of Non-Communicable Diseases” por Pangestuti & Kim, 2017.	41
Figura 2.13. Diagrama simplificado de la cascada de coagulación. Tomada y modificada de “Hemostasis and Thrombosis” por Capurso & Capurso, 2020.	45
Figura 2.14. Modelo de digestión gastrointestinal in vitro.	50
Figura 2.15. Transporte de péptidos bioactivos desde el lado apical de una monocapa de células Caco-2 cultivadas en la membrana del inserto, hasta el lado basolateral de “Bioavailability of bioactive peptides derived from food proteins across the intestinal epithelial membrane: A review” por Xu et al., 2019.	52
Figura 3.1. Proceso de extracción de grasa de las vísceras de trucha arcoíris.	61
Figura 3.2. Producción de hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	71
Figura 3.3. Secuencia de ultrafiltración con las fracciones de hidrolizado obtenidas.	94
Figura 4.1. Extracción de lípidos de las vísceras de trucha arcoíris.	99
Figura 4.2. Superficie de respuesta para AP en función del pH y la temperatura.	106
Figura 4.3. Superficie de respuesta para GH en función de la concentración de sustrato y enzima, (temperatura 60 °C).	109
Figura 4.4. Grado de hidrólisis (GH) vs tiempo de reacción (t). S = 5,45%, e = 0,72 UA/g, T = 60 °C y pH = 8,5. (I) desviaciones estándar.	111
Figura 4.5. Superficie de respuesta para GH en función de la concentración de grasa y velocidad de agitación, (S = 5,45%, e = 0,72 UA/g, T = 60 °C y pH = 8,5).	114
Figura 4.6. Grado de hidrólisis (GH) vs tiempo de reacción (t). S = 5,45%, e = 0,72 UA/g, T = 60°C, pH = 8,5, G = 5,09% y v = 102 rpm. (I) desviaciones estándar.	115

Figura 4.7. Electroforesis SDS-PAGE. 1). HT 8 mg/mL; 2). VT 4 mg/mL; 3). VT 8 mg/mL; M). Marcador de pesos moleculares.	121
Figura 4.8. Perfiles cromatográficos de VT (—) y HT (—) en la columna Superdex 75 10/300 GL. (•) Peso molecular de los marcadores en kDa.	122
Figura 4.9. Perfiles cromatográficos de VT (—) y HT (—) en la columna Superdex peptide 10/300 GL. (•) Peso molecular de los marcadores en kDa.	123
Figura 4.10. Curva de saturación de la hidrólisis de vísceras de trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) con Alcalasa® 2.4L. Datos experimentales (•), modelo sin inhibición (— —), inhibición incompetitiva por sustrato (—).	125
Figura 4.11. Gráficos de Lineweaver-Burk para la hidrólisis de vísceras de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) con Alcalasa® 2.4L con diferentes concentraciones de producto, 0% (•), 5% (•) y 10% (•).	126
Figura 4.12. GH vs t a diferentes S_0 : 20 mM (◊); 39 mM (+); 78 mM (□); 235 mM (x); 433 mM (Δ); 861 mM (○) con $e_0 = 0,62$ mM, $T = 60^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 8,5$. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas los valores predichos por el modelo ajustado ecuación 3.8).	128
Figura 4.13. GH vs t a diferentes e_0 : 0,02 mM (◊); 0,21 mM (+); 0,41 mM (□); 0,62 mM (Δ); 1,02 mM (○) con $S_0 = 433$ mM, $T = 60^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 8,5$. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas son los valores predichos por modelo ajustado (ecuación 3.8).	129
Figura 4.14. Relación a/b vs e_0/S_0 para la determinación de la constante cinética k_d	130
Figura 4.15. Curvas de GH vs t, usadas para la validación del modelo sin inhibición (ecuación 4.4), a diferentes S_0 : 20 mM (x); 78 mM (□); 433 mM (Δ); 861 mM (○) con $e_0 = 0,62$ mM, $T = 60^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 8,5$. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas los valores predichos por el modelo.	132
Figura 4.16. Curvas GH vs t, usadas para la validación del modelo de inhibición por sustrato (ecuación 4.5), a diferentes S_0 : 20 mM (x); 78 mM (□); 433 mM (Δ); 861 mM (○) con $e_0 = 0,62$ mM, $T = 60^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 8,5$. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas los valores predichos por el modelo ajustado.	133
Figura 4.17. Curvas GH vs t usadas para la validación del modelo de inhibición por producto (ecuación 4.6), a diferentes S_0 : 20 mM (x); 78 mM (□); 433 mM (Δ); 861 mM (○) con $e_0 = 0,62$ mM, $T = 60^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 8,5$. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas son los valores predichos por el modelo ajustado.	134
Figura 4.18. Curvas GH vs t, usadas para la validación del modelo de inhibición por sustrato y producto (ecuación 4.7), a diferentes S_0 : 20 mM (x); 78 mM (□); 433 mM (Δ); 861 mM (○) con $e_0 = 0,62$ mM, $T = 60^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 8,5$. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas son los valores predichos por el modelo ajustado. .	134
Figura 4.19. Actividad antioxidante (ORAC) de HT a diferentes GH. Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$). ..	137
Figura 4.20. Actividad antioxidante (HORAC) de HT a diferentes GH. Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).	137

Figura 4.21. Actividad antioxidante (ABTS) de HT a diferentes GH. Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$). ..	139
Figura 4.22. Actividad antioxidante (FRAP) de HT a diferentes GH. Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$). ..	139
Figura 4.23. Perfiles cromatográficos de las fracciones de HT (GH = 20%), HT-F1 (—) y HT-F2 (—) HT-F3 (—) y HT-F4 (—) en la columna Superdex 75 10/300 GL. (•) Peso molecular de los marcadores en kDa.	143
Figura 4.24. Actividad IECA de HT a diferentes GH. A. Inhibición (%) a 3 mg/mL. B. Valores IC ₅₀ (mg de proteína/mL). Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).	146
Figura 4.25. Actividad IECA de las fracciones de HT. Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).	149
Figura 4.26. Actividad anticoagulante de HT a diferentes GH, medida por el tiempo de protrombina (PT). Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).	152
Figura 4.27. Actividad anticoagulante de HT a diferentes GH, medida por el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT). Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).	152
Figura 4.28. Perfiles cromatográficos de VT (—), VTD (---), HT (—) y HTD (---) en la columna Superdex 75 10/300 GL. (•) Peso molecular de los marcadores en kDa.	156
Figura 4.29. Perfiles cromatográficos de VT (—), VTD (---), HT (—) y HTD (---) en la columna Superdex peptide 10/300 GL. (•) Peso molecular de los marcadores en kDa.	157
Figura 4.30. Actividad antioxidante de VT, HT y sus digeridos gastrointestinales VTD y HTD. A. ORAC. B. HORAC. C. ABTS. D. FRAP. Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).	159
Figura 4.31. Actividad IECA de VT, HT y sus digeridos gastrointestinales VTD y HTD. Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).	161
Figura 4.32. Contenido (mg/g de proteína) de carnosina (■) y anserina (■). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras para el mismo dipéptido. Letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre carnosina y anserina para la misma muestra. (I) desviaciones estándar.	162
Figura 4.33. A. Perfiles cromatográficos FPLC indicando las fracciones obtenidas para VTD (—) y HTD (—). B. Actividad ORAC. C. Actividad HORAC de las fracciones de VTD (—) y HTD (—). (•) Peso molecular de los marcadores en kDa. Las barras representan la desviación estándar.	164
Figura 4.34. Efecto de HT, HTD y VTD sobre la citotoxicidad de las células Caco-2/TC7 según lo evaluado por el ensayo LDH. Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre las concentraciones de la misma muestra ($p < 0,05$).	166
Figura 4.35. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de HT a 1 mg/mL. A. Muestra original. B. Cámara apical. C. Cámara basolateral.	168

Figura 4.36. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de HT-F3 a 1 mg/mL. A. Muestra original. B. Cámara apical. C. Cámara basolateral.....	169
Figura 4.37. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de HT-F4 a 1 mg/mL. A. Muestra original. B. Cámara apical. C. Cámara basolateral.....	170
Figura 4.38. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de HTD a 0,25 mg/mL. A. Muestra original. B. Cámara apical. C. Cámara basolateral.....	171
Figura 4.39. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de HTD-23 a 0,88 mg/mL. A. Muestra original. B. Cámara apical. C. Cámara basolateral.....	172
Figura 4.40. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de HTD-28 a 0,23 mg/mL. A. Muestra original. B. Cámara apical. C. Cámara basolateral.....	173
Figura 4.41. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de VTD a 0,25 mg/mL. A. Muestra original. B. Cámara apical. C. Cámara basolateral.....	175
Figura 4.42. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de VTD-28 a 0,13 mg/mL. A. Muestra original. B. Cámara apical. C. Cámara basolateral.....	176
Figura 4.43. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de VTD-31 a 0,56 mg/mL. A. Muestra original. B. Cámara apical. C. Cámara basolateral.....	177
Figura 4.44. Solubilidad de HT en función del GH (%) y a diferentes valores de pH: 4 (●), 7 (■) y 10 (◆). Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).	180
Figura 4.45. Índice de actividad emulsionante (IAE) de HT en función del GH (%) y a diferentes valores de pH: 4 (—), 7 (—) y 10 (—). Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).	182
Figura 4.46. Índice de estabilidad de la emulsión (IEE) de HT en función del GH (%) y a diferentes valores de pH: 4 (—), 7 (—) y 10 (—). Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).	183
Figura 4.47. Capacidad Espumante (CE) de HT en función del GH (%) y a diferentes valores de pH: 4 (—), 7 (—) y 10 (—). Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).	185
Figura 4.48. Estabilidad de la espuma (EE) de HT en función del GH (%) y a diferentes valores de pH: 4 (—), 7 (—) y 10 (—). Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).	186

LISTA DE ABREVIATURAS

AAE:	Aminoácidos esenciales.
ABTS:	Ácido 2,2' azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico.
ACE:	Ácido clorogénico equivalente.
AH:	Ácido hipúrico.
ANOVA:	Análisis de la varianza.
AP:	Actividad proteolítica.
APTT:	Tiempo de tromboplastina parcial activada.
CE:	Capacidad espumante.
DHA:	Ácido docosahexaenoico.
<i>e</i> :	Concentración de enzima.
E/S:	Relación enzima/sustrato.
<i>eo</i> :	Concentración inicial de enzima.
ECA	Enzima convertidora de angiotensina.
EE:	Estabilidad de la espuma.
EP:	Complejo enzima-producto.
EPA:	Ácido eicosapentaenoico.
ES:	Complejo enzima-sustrato.
ET:	Equivalente Trolox.
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
FPLC:	Fast Protein Liquid Chromatography.
FRAP:	Poder antioxidante férrico reductor.
G:	Concentración de grasa.
GH:	Grado de hidrólisis.
GI:	Gastrointestinal.
h:	Enlaces peptídicos rotos.
HAT:	Transferencia de átomos de hidrógeno.
HHL:	Hipuril-histidil-leucina.
HORAC:	Capacidad de inhibición del radical hidroxilo.
HT:	Hidrolizados enzimáticos de vísceras de trucha arcoíris
HTD:	Hidrolizados enzimáticos de vísceras de trucha arcoíris digeridos.
HT-F1:	Fracción de HT con MW > 100 kDa.
HT-F2:	Fracción de HT con MW entre 100 – 10 kDa.
HT-F3:	Fracción de HT con MW entre 10 – 3 kDa.
HT-F4:	Fracción de HT con MW < 3 kDa.
<i>h_{tot}</i> :	Número total de enlaces peptídicos en una proteína.
IAE:	Índice de actividad emulsionante.
IEE:	Índice de estabilidad emulsionante.
IC ₅₀ :	Concentración de proteína necesaria para lograr una inhibición del 50%.

IECA:	Inhibidora de la ECA.
k_2 :	Constante de velocidad catalítica.
k_d :	Constante cinética de inactivación térmica.
K_m :	Constante de Michaelis-Menten.
K_P :	Constante de inhibición por producto.
K_S :	Constante de inhibición por sustrato.
LDH	Enzima lactato deshidrogenasa.
MCL:	Miosina de cadena ligera.
MCP:	Miosina de cadena pesada.
MW	Peso molecular.
MWCO	Peso molecular de corte.
N-AAE:	Aminoácidos no esenciales.
NMP:	Número más probable de bacterias.
OPA:	Orto-ftaldialdehído.
ORAC:	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno.
P:	Concentración de producto.
PCL:	Longitud promedio de cadena peptídica.
PPP:	Plasma pobre en plaquetas.
PT:	Tiempo de protrombina.
RMSE:	Error medio cuadrático.
ROO•:	Radical peroxilo.
ROS:	Especies reactivas del oxígeno.
RSM:	Metodología de superficie de respuesta.
S:	Concentración de sustrato.
S_0 :	Concentración inicial de sustrato.
SES:	Complejo terciario sustrato-enzima-sustrato.
SET:	transferencia de electrones.
SSE:	Suma de errores cuadrados.
T:	Temperatura.
TCA:	Ácido tricloroacético.
TFA:	Ácido trifluoroacético.
TNBS:	Ácido trinitro-bencenosulfónico.
t_R :	Tiempo de retención.
UA:	Unidades Anson.
UFC:	Unidades Formadoras de Colonias.
v :	Velocidad de reacción.
V:	Vísceras de trucha arcoíris frescas.
v :	Velocidad de agitación.
v_0 :	Velocidad inicial de reacción.
V_{max} :	Velocidad máxima de reacción.

VT: Vísceras de trucha arcoíris procesadas y desengrasadas.
VTD: Vísceras de trucha arcoíris digeridas.
 α : Grado de disociación promedio de los grupos α -NH.
 α -NH: Grupos alfa amino terminales.
•OH: Radical hidroxilo.

RESUMEN

Las vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) son consideradas fuente importante de proteínas y lípidos; sin embargo, la mayoría de las veces son descartadas sin ningún intento de recuperación debido a que son clasificadas como residuos de la industria acuícola, generando un gran impacto ambiental. Una de las alternativas para el aprovechamiento de este tipo de subproducto es la hidrólisis enzimática, debido a que convierte las proteínas de las vísceras en productos de mayor valor agregado con mejores características funcionales y bioactivas. No obstante, La hidrólisis enzimática es un proceso complejo debido a la cantidad de factores que influyen en ella, lo que hace interesante un entendimiento profundo de la cinética de reacción. Por lo anterior, se realizó inicialmente una evaluación *in vitro* de las condiciones óptimas (pH y temperatura) que maximizan la actividad proteolítica (AP) de Alcalasa® 2.4L en la hidrólisis de las vísceras de trucha arcoíris (VT). Posteriormente, se optimizó las condiciones de operación de la hidrólisis enzimática de VT con Alcalasa® 2.4L para encontrar el mayor grado de hidrólisis (GH), utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM) para evaluar el efecto de la concentración de sustrato (*S*), concentración de enzima (*e*), concentración de grasa (*G*), velocidad de agitación (*v*) y temperatura (*T*) sobre GH. Una vez obtenidos los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris (HT), se evaluó la influencia del GH y el peso molecular sobre las actividades biológicas: antioxidante, inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y anticoagulante de HT como también su bioaccesibilidad, además se estudió el efecto del GH y el pH sobre las propiedades funcionales: solubilidad, propiedades emulsionantes y espumantes. Se encontró que las condiciones de operación óptimas que maximizan el GH a un pH de 8,5 y 60°C, luego de 6 horas de hidrólisis son 5,45% (m/v), 0,72 UA/g de proteína, 5,09% (m/m) y 102 rpm para *S*, *e*, *G* y *v*, respectivamente, obteniéndose un GH máximo de $20,48 \pm 1,07\%$. Los resultados demostraron que el GH y el peso molecular tienen influencia sobre las actividades antioxidante e IECA de HT, alcanzando las mayores actividades en la fracción menor a 3 kDa (HT-F4). Asimismo, se encontró que la digestión GI *in vitro* no alteró la actividad ORAC e IECA de HT, sin embargo, ocasiono un aumento en las actividades HORAC, ABTS y FRAP de dichos hidrolizados. Además, parte de los compuestos presentes en HT lograron atravesar en cierta proporción la monocapa de células Caco-2/TC7, que simula la pared intestinal. Finalmente, se halló que el GH y el pH influyen significativamente sobre las propiedades funcionales de HT, donde sus valores más altos para las propiedades emulsionantes y espumantes se dan a GH bajos (5%), contrario a la solubilidad, cuyos valores máximos se presentan a GH altos (20%), sin embargo, se encontró que todas propiedades funcionales a los diferentes GH, presentaron los valores más bajo a pH 4.

Palabras clave: subproductos de pescado, hidrólisis enzimática, péptidos bioactivos, proteínas funcionales.

ABSTRACT

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera are considered an important source of protein and lipids. However, most of the time, they are discarded without any attempt at recovery because they are classified as waste from the aquaculture industry, generating environmental problems. One of the alternatives to taking advantage of this type of by-product is enzymatic hydrolysis. It converts the proteins from the viscera into greater value-added products with better functional and bioactive characteristics. Nevertheless, enzymatic hydrolysis is a complex process due to the factors that influence it, making a deep understanding of reaction kinetics interesting. Therefore, an *in vitro* evaluation of the optimal conditions (pH and temperature) that maximize the proteolytic activity (AP) of alcalase® 2.4L in the hydrolysis of the rainbow trout viscera (VT) was initially performed. Subsequently, the operating conditions of the enzymatic hydrolysis of VT with alcalase® 2.4L were optimized to find the highest degree of hydrolysis (GH), using the response surface methodology (RSM) to evaluate the effect of substrate concentration (S), enzyme concentration (e), fat concentration (G), agitation speed (v) and temperature (T) on GH. Once the hydrolysates from rainbow trout viscera (HT) were obtained, the influence of GH and molecular weight on biological activities (antioxidant, IECA and anticoagulant) of HT was evaluated, as well as its bioaccessibility and the effect of GH and pH on functional properties: solubility, emulsifying and foaming properties. The study found that the highest GH of $20.48 \pm 1.07\%$ was attained under the optimum conditions, including S of 5.45% (w/v), e of 0.72 UA/g protein, G of 5.09% (w/w), v of 102 rpm, at pH 8.5 and 60 °C, during a reaction time of 6 h. The results demonstrated that GH and molecular weight influence HT's antioxidant and IECA activities, reaching the highest activities in the < 3 kDa fraction (HT-F4). Likewise, it was found that *in vitro* GI digestion did not alter the ORAC and IECA activities of HT; however, it caused an increase in the HORAC, ABTS and FRAP activities of HT. Also, part of the compounds present in HT could cross the Caco-2/TC7 cell monolayer in a certain proportion. Finally, it was found that GH and pH significantly influence the functional properties of HT, where its highest values for emulsifying and foaming properties are given at low GH (5%), contrary to solubility, whose maximum values are presented at high GH (20%), however, it was found that all functional properties to the different GH presented the lowest values at pH 4.

Keywords: Fish by-products, enzymatic hydrolysis, bioactive peptides, functional proteins.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del Problema

El total de la producción acuícola mundial ha aumentado continuamente durante la última década, alcanzando 114 millones de toneladas en el 2018, del cual se estima que un 88% se utilizó para consumo humano directo (FAO, 2020). En Colombia dicho sector presentó una producción de 171 mil toneladas para el año 2019, donde la trucha arcoíris representó aproximadamente el 16% del total, convirtiéndola en la tercera especie de mayor producción en el país, después de la tilapia roja (*Oreochromis spp.*) y la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) (Dirección de Cadenas Pecuarias-Colombia, 2020). El crecimiento mundial de este sector causa preocupación por el impacto ambiental generado, debido a que este tipo de industrias descartan entre el 40 - 60% de su producción como residuos, los cuales la mayoría de las veces son descartados sin ningún intento de recuperación o subutilizados para elaborar productos de bajo valor agregado (Arvanitoyannis & Tserkezou, 2014; Chalamaiah, Dinesh Kumar, Hemalatha, & Jyothirmayi, 2012). Colombia no es ajena a dicha problemática, ya que, para el caso de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), el porcentaje de subproductos se encuentra entre el 50 - 70% (Torres, Chen, Rodrigo-Garcia, & Jaczynski, 2007). Siendo las vísceras su subproducto más representativo, debido a que constituyen entre el 12 al 20% del peso total del pescado, además de ser consideradas fuente importante de proteínas y lípidos (Martínez-Alvarez, Chamorro, & Brenes, 2015).

Existen diversas alternativas que están siendo utilizadas para el aprovechamiento de estos tipos de subproductos, entre las cuales se encuentran: la hidrólisis, la biorremediación, el ensilaje y la filtración (Arvanitoyannis & Tserkezou, 2014). No obstante, la hidrólisis es una de las técnicas más utilizadas, debido a que convierte las proteínas de los subproductos de pescado en productos de mayor valor agregado con mejores nutrientes, buenas características funcionales y bioactivas (H. Y. Jung & Kim, 2016; Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Esta puede realizarse tanto por métodos químicos (ácidos o alcalinos) como por métodos biológicos (enzimáticos), siendo los primeros los más económicos y simples. Sin embargo, el proceso de hidrólisis química es difícil de controlar y genera productos con composición química y propiedades funcionales variables, lo cual limita su uso como ingrediente para alimentos. Además, se realiza a condiciones extremas de temperatura y pH, lo cual puede

degradar las propiedades nutricionales de los productos finales (Ghaly, Ramakrishnan, Brooks, Budge, & Dave, 2013; S. He, Franco, & Zhang, 2013; H. Y. Jung & Kim, 2016; Kristinsson & Rasco, 2000a; Yathisha, Bhat, Karunasagar, & Mamatha S., 2018). Por su parte, la hidrólisis enzimática es uno de los métodos más empleados en el aprovechamiento de subproductos acuícolas, debido a que presentan diversas ventajas, tales como: condiciones más suaves de reacción y alta especificidad de la enzima por el sustrato, además de producir hidrolizados sin residuos de disolventes orgánicos o productos químicos tóxicos (Kristinsson & Rasco, 2000a; Martínez-Medina et al., 2019; Soares de Castro & Sato, 2015). No obstante, La hidrólisis enzimática de proteínas es un proceso complejo debido a la cantidad de factores que influyen en ella, como por ejemplo: la naturaleza y calidad del sustratos, la concentración y especificidad de la enzima, elementos que hacen difícil un modelado fenomenológico de la cinética de reacción (Qi & He, 2006; Qu, Ma, Zhao, & Pan, 2013; Trusek-Holownia, 2008; Valencia, Espinoza, Ceballos, Pinto, & Almonacid, 2015; Valencia, Pinto, & Almonacid, 2014). Debido a lo anterior, son pocos los estudios cinéticos realizados en subproductos de pescado, algunos de ellos se han hecho en cabezas y esqueleto de bagre (*Ictalurus punctatus*) (Tan, Chang, & Meng, 2019), vísceras de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) (Zapata, Giraldo, & Baéz, 2018) y músculo de salmón (*Salmo salar*) (Valencia et al., 2015), siendo escasos los estudios realizados en subproductos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Los hidrolizados enzimáticos de proteína de subproductos acuícolas, se caracterizan principalmente por tener péptidos con un excelente equilibrio de aminoácidos, una buena digestibilidad y una rápida absorción (Guerard, 2007; Kristinsson, 2007). Estos compuestos bioactivos contienen generalmente entre 2 a 20 residuos de aminoácido, los cuales dependiendo de su composición y secuencia poseen diversas actividades biológicas, como: inhibidoras de la ECA (Ketnawa, Suwal, Huang, & Liceaga, 2018; Thuanthong, De Gobba, Sirinupong, Youravong, & Otte, 2017), antioxidantes (Gómez, Gómez, Zapata, et al., 2019; Nikoo, Benjakul, Yasemi, Ahmadi Gavlighi, & Xu, 2019), antimicrobianas (Aissaoui, Chobert, Haertle, Marzouki, & Abidi, 2017; Wald, Schwarz, Rehbein, Bußmann, & Beermann, 2016), antitrombóticas (R. Nasri et al., 2012), anticancerígenas (Halim, Azlan, Yusof, & Sarbon, 2018), entre otras. Siendo el salmón (Ahn, Kim, & Je, 2014; Neves, Harnedy, O’Keeffe, & FitzGerald, 2017; Opheim et al., 2015; Slizyte et al., 2016), el bacalao

(Girgih et al., 2015; Ngo, Vo, Ryu, & Kim, 2016; Sabeena Farvin et al., 2016; W. Wu, Li, Hou, Zhang, & Zhao, 2017), la carpa (Cai et al., 2015; Tkaczewska, Jamroz, Kulawik, Morawska, & Szczurowska, 2019; Yi, De Gobba, Skibsted, & Otte, 2016; C. Zhang, Zhang, Wang, Chen, & Luo, 2017) y el atún (Ahmed & Chun, 2018; Klomklao & Benjakul, 2018; L. Zhang et al., 2019) algunas de las especias más investigadas para el aislamiento de péptidos bioactivos. No obstante, a pesar de la gran popularidad de la trucha y su excelente valor nutricional, existen pocos estudios sobre su contenido de péptidos biológicamente activos (Korczyk, Tkaczewska, & Migdał, 2018). Otras de las características que poseen los hidrolizados de subproductos de pescado son las propiedades funcionales, poco investigadas, pero importantes en la formulación de alimentos, entre las que se encuentran capacidad emulsionante, capacidad de retención de aceite, capacidad espumante y capacidad de retención de agua (Noman et al., 2018; Sripokar, Benjakul, & Klomklao, 2019).

Diversas investigaciones, han establecido la relación existente entre la actividad biológica de los péptidos y su peso molecular, estas han determinado que las fracciones de péptidos con pesos moleculares entre 1 - 4kDa, serían los más interesantes para usos nutricionales y farmacéuticos (Balti et al., 2015; C. Liu, Ma, Che, Wang, & Li, 2018; Malaypally et al., 2014; Opheim et al., 2015; Saidi, Deratani, Belleville, & Amar, 2014), es por esto que las técnicas de separación y purificación de los hidrolizados de subproductos acuícolas son un tema clave para la obtención de péptidos bioactivos. Actualmente, existen varias tecnologías para el aislamiento y purificación a escala piloto de péptidos bioactivos según su peso molecular, como por ejemplo técnicas de separación por membrana, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía en fase reversa (Agyei, Ongkudon, Wei, Chan, & Danquah, 2016; Lafarga & Hayes, 2017; Li-Chan, 2015). No obstante, las tecnologías de separación por membranas (ultrafiltración y nanofiltración) son una buena opción en comparación con las técnicas de separación tradicional, debido a que su proceso es más rentable y amigable con el ambiente (Abejón, Belleville, Sanchez-Marcano, Garea, & Irabien, 2018; Sila & Bougatef, 2016).

Es evidente la necesidad de trabajos científicos que conduzcan a la generación de hidrolizados enzimáticos de proteínas a partir del aprovechamiento de subproductos de

pescado, y así mitigar el impacto ambiental generado por su disposición. Dichos hidrolizados muestran ser una alternativa prometedora para la obtención de péptidos bioactivos y/o proteínas con propiedades funcionales, los cuales pueden tener un uso potencial en la industria farmacéutica y alimentaria. En este contexto se propone un proyecto de investigación encaminado a dar valor agregado a las vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) por medio de la hidrólisis enzimática, para obtener compuestos con actividad biológica y/o funcional, lo cual tiene alta pertinencia debido a las escasas investigaciones que existe sobre esta especie y a su importancia comercial en la acuicultura nacional.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Obtener hidrolizados de proteínas de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con propiedades bioactivas y/o funcionales.

1.2.2. Objetivos Específicos

Optimizar los parámetros de operación (concentración de enzima, concentración de sustrato, concentración de grasa y velocidad de agitación) para la hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa®2.4L.

Modelar la cinética de reacción de la hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa®2.4L.

Evaluar las propiedades bioactivas: antioxidante, inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina y anticoagulante de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Evaluar las propiedades funcionales: solubilidad, propiedades emulsionantes y espumantes de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

Caracterizar los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con propiedades biológicas y/o funcionales.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

2.1.1. Generalidades

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es un pez de la familia de los salmónidos (Figura 2.1), su cuerpo es alargado, un tanto comprimido y con una amplia banda color rosácea en la línea lateral. Generalmente en la madurez puede alcanzar los 80 cm de largo, aunque el tamaño más común se encuentra entre 20 a 40 cm, con un peso que puede variar entre los 500 g a los 6 kg, lo cual va a depender de la temperatura del agua y la disponibilidad de alimentos. Posee escamas pequeñas y de colores tornasolados, con el dorso de color azul a verde oliva, los flancos plateados y vientre blanquecino, además presenta manchas negras en la cabeza, cuerpo, aletas dorsales y cola, aunque su coloración varía en función del hábitat, la alimentación, el tamaño y la condición sexual. Es un pez resistente, fácil de desovar, de rápido crecimiento y tolerante a una amplia gama de entornos y manipulación, por lo cual se le considera una especie más sencilla de estabular en comparación a otras especies de salmónidos. Aunque la trucha arcoíris puede tolerar temperaturas que van desde los 0 °C hasta los 27 °C, la temperatura óptima del agua para su cultivo debe ser inferior a 21 °C (FAO, 2005; Moyle, Quiñones, Katz, & Weaver, 2015).



Figura 2.1. Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), de “A Trout’s Anatomy”, por Hiff, 2012.

Esta especie, originaria del norte de América, se encuentra presente de forma natural en los ríos que desembocan en el Pacífico, desde el sur de Alaska hasta el norte de México. Desde 1874 se ha introducido en aguas de todos los continentes, excepto la Antártida (FAO,

2005). En Colombia se introdujo en alrededor de 1930 con fines de pesca recreativa y acuicultura, en aguas de uso público, específicamente en el lago de Tota en Boyacá, aunque actualmente se encuentran en la mayoría de los cuerpos de agua fría del país (FAO, 2019; Merino, Bonilla, & Bages, 2013).

2.1.2. Producción

La producción mundial de trucha arcoíris ha tenido un gran crecimiento en las últimas décadas, aumentado de 6 mil toneladas en el año 1953 a 848 mil toneladas para el año 2018 (Figura 2.2) (FAO, 2020). Este incremento se ha dado especialmente en Europa, debido al aumento de la producción en países como Francia, Italia, Dinamarca, Alemania, Noruega y España, para abastecer los mercados nacionales. Igualmente, se ha presentado incremento en la producción de trucha arcoíris en América del Sur, debido a que Chile es actualmente el mayor productor a nivel mundial. Otros países productores importantes incluyen Estados Unidos, Irán y el Reino Unido (FAO, 2018).

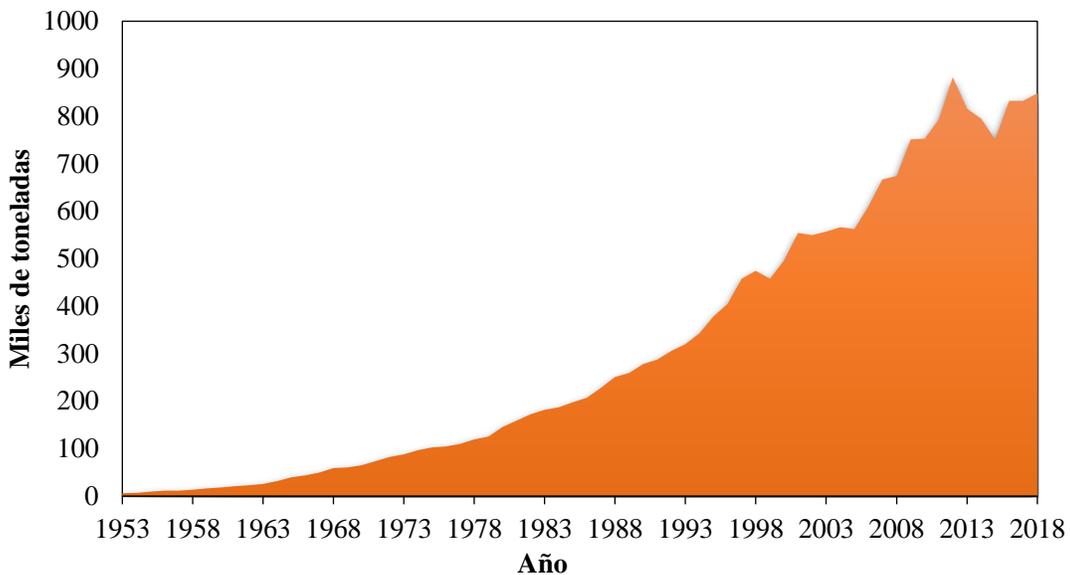


Figura 2.2. Producción mundial de trucha arcoíris.

En el caso de Colombia, también se ha presentado un aumento en los últimos 30 años en la producción de dicha especie, pasando de una producción de 400 toneladas en el año 1987 a 26.471 toneladas para el año 2019, representando aproximadamente el 16% de la producción total acuícola nacional, y convirtiendo así a la trucha arcoíris en la tercera especie de mayor producción en el país, después de la tilapia roja (*Oreochromis spp.*) y la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) (Dirección de Cadenas Pecuarias-Colombia, 2020; FAO, 2019). Los principales departamentos productores de trucha arcoíris son Antioquia, Cauca, Valle del Cauca, Boyacá y Cundinamarca; siendo Antioquia el mayor productor del país, abarcando un 30% de la producción nacional (Merino et al., 2013).

2.2. Subproductos acuícolas

La acuicultura es posiblemente el sector de producción de alimentos con mayor crecimiento (Figura 2.3), representando actualmente casi el 50% de los productos pesqueros mundiales destinados a la alimentación humana. De los 114 millones de toneladas de producción total acuícola en 2018, alrededor del 88% (aproximadamente 100 millones de toneladas) se utilizó para el consumo humano directo, una proporción que ha aumentado significativamente en las últimas décadas (FAO, 2020). A pesar de las mejoras en las prácticas de procesamiento y distribución de pescado, las pérdidas actualmente representan entre el 40 al 60% por ciento del pescado producido, lo cual va a ser función del nivel de procesamiento y el tipo de especie procesada (Arvanitoyannis & Tserkezou, 2014; Chalamaiah et al., 2012).

Estos residuos o subproductos son principalmente restos de fileteo (15 - 20%), piel y aletas (1 - 3%), esqueleto (9 - 15%), cabezas (9 - 12%), vísceras (12 - 18%) y escamas (5%) (Martínez-Alvarez et al., 2015), siendo utilizados la mayoría de las veces para la producción de productos no alimenticios como harinas y aceites de pescado, pese a ser considerados buena fuente de proteínas y lípidos en comparación con otros subproductos de origen vegetal y animal (Friedman, 1996). Los subproductos de pescado poseen compuestos de alto valor agregado como colágeno, gelatina, ácidos grasos poliinsaturados (EPA y DHA) y minerales (Benjakul, Yarnpakdee, Senphan, Halldorsdottir, & Kristinsson, 2014; Esteban, Garcia, Ramos, & Marquez, 2007; Ghaly et al., 2013). En cuanto a su contenido proteico, este puede

variar aproximadamente entre 8 y 50% de acuerdo con el tipo de especie, edad, estado nutricional, estado de salud del animal y tipo de subproducto (Tabla 2.1). Este último también va a determinar la composición proteica, debido a que cada subproducto está conformado por diferentes tejidos, como por ejemplo los restos de fileteo, los cuales corresponden a músculo esquelético (estriado); los subproductos como esqueleto, cabeza y aletas compuestos por tejido óseo o en caso de las vísceras compuestas en su mayoría por tejido muscular visceral o músculo liso y tejido conectivo (estroma), las cuales contienen proteínas como miosina, actina, tropomiosina, elastina, colágeno tipo III, glucoproteínas y calmodulina, además de enzimas como pepsina, tripsina, quimotripsina y colagenasa (Gabella, 2002; Gehring, Davenport, & Jaczynski, 2009; Khan et al., 2020; Villamil, Vaquiro, & Solanilla, 2017).

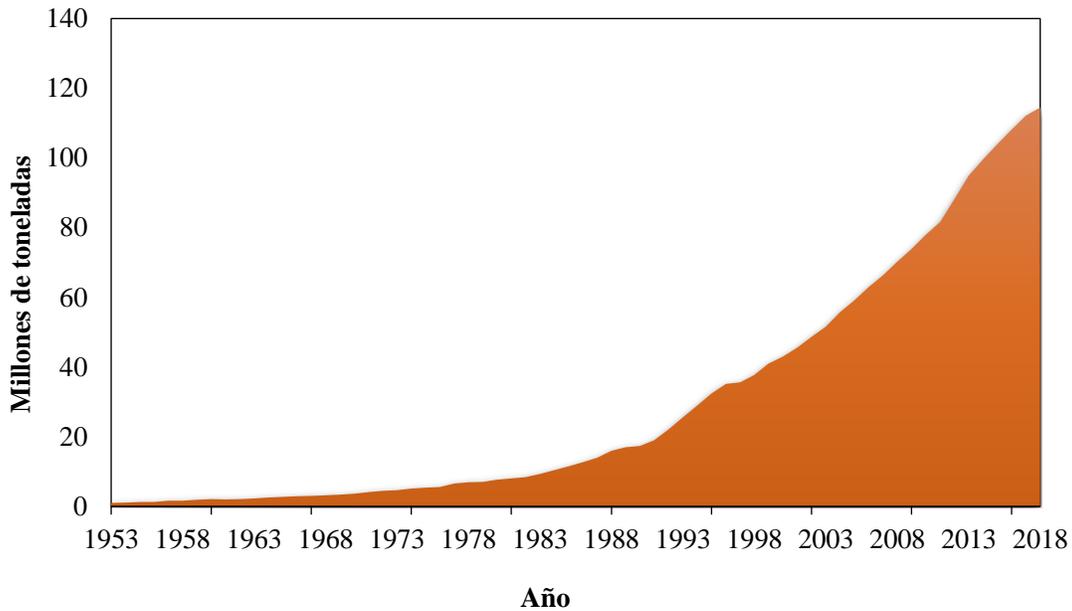


Figura 2.3. Producción acuícola mundial.

Uno de los subproductos que contiene estos compuestos de alto valor nutricional son las vísceras, lo que las convierte en uno de los subproductos más importantes. Estas incluyen un conjunto de órganos, entre los que están intestinos, hígado, vejiga natatoria, estómago y gónadas, que comprenden aproximadamente entre el 12 al 20% del peso total del pescado (Bougatef, 2013; Villamil et al., 2017). Se estima que actualmente más de 20 millones de toneladas de vísceras de pescado se producen a nivel mundial por año, sin embargo, la

mayoría de las veces son descartadas, ocasionando problemas ambientales, o son subutilizadas para elaborar productos de bajo valor comercial, como alimentos para animales o fertilizantes (Arvanitoyannis & Tserkezou, 2014; Hayes & Flower, 2013).

Tabla 2.1. Composición proximal de subproductos de diversas especies acuícolas

Especie	Subproducto	Proteína (%)	Grasa (%)	Humedad (%)	Ceniza (%)	Referencia
Catla (<i>Catla catla</i>)	Vísceras	8,5 ± 0,9	12,5±1,5	76,2 ±0,3	2,5	Bhaskar & Mahendrakar (2008)
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Músculo	20,3	6,2	71,2	1,9	Kim & Byun (2012)
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Vísceras	15 ± 0,1	13 ± 0,8	71,7 ± 0,9	2,7 ± 0,9	Taheri, Anvar, Ahari, & Fogliano (2013)
Tilapia roja (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Cabeza, esqueleto y cola	14,6 ± 0,3	5,5 ± 0,3	66,6 ± 0,4	8,9 ± 0,5	Roslan, Yunos, Abdullah, & Kamal (2014)
Tilapia (<i>Oreochromis nilotica</i>)	Esqueleto	50,6	30,6	65,3	15,3	Chuesiang & Sanguandeeikul (2015)
Salmon del Atlántico (<i>Salmo salar</i>)	Vísceras	8 ± 2	44 ± 9	60 ± 8	1 ± 0	Opheim et al. (2015)
	Cabeza	13 ± 1	22 ± 2	39 ± 4	4 ± 1	
	Esqueleto	15 ± 1	27 ± 1	42 ± 2	4 ± 1	
Esturión chino (<i>Acipenser sinensis</i>)	Músculo	15,2 ± 0,7	3,2 ± 0,1	74,9 ± 0,3	1,0 ± 0,03	Noman et al. (2018)

2.3. Producción de hidrolizados de proteínas de subproductos acuícolas

Las proteínas de subproductos acuícolas pueden hidrolizarse por métodos químicos (tratamientos ácidos o alcalinos) o por métodos bioquímicos, mediante la utilización de enzimas proteolíticas, ya sea que estén presentes en los tejidos de los subproductos (autólisis)

o por la adición de enzimas comerciales para acelerar el proceso (hidrólisis enzimática). El objetivo principal de la hidrólisis es aumentar la recuperación de proteínas y el rendimiento de componentes valiosos, con propiedades diferentes a la proteína original (Aspevik et al., 2017; Kristinsson, 2007; Petrova, Tolstorebrov, & Eikevik, 2018).

La hidrólisis química es un método relativamente económico y simple para escisión de las proteínas de subproductos de pescado, sin embargo, es un proceso difícil de controlar, generando productos con composición y funcionalidad variable. Además, generalmente este tipo de hidrólisis de proteínas se realiza a condiciones de pH muy bajo o alto y a temperaturas que oscilan entre los 100 a 120 °C, ocasionando productos con cualidades nutricionales reducidas y con poca funcionalidad (Kristinsson, Theodore, & Ingadottir, 2007). Por otro lado, los procesos basados en enzimas, especialmente la hidrólisis enzimática, son los más comúnmente empleados en el aprovechamiento de subproductos acuícolas, debido a que presentan numerosas ventajas en comparación con la hidrólisis química, tales como las siguientes (Martínez-Medina et al., 2019):

- Condiciones más suaves de reacción, ya que se producen a temperaturas inferiores a 100 °C, a presión atmosférica y a un pH cercano a la neutralidad.
- Alta especificidad de reacción, debido a que las enzimas tienen mayor especificidad por el sustrato y no producen productos de degradación hidrolítica a través de reacciones de racemización.
- Las velocidades de reacción se pueden controlar fácilmente mediante el ajuste de temperatura, pH o concentración de enzima.
- Mayores velocidades de reacción, presentando órdenes superiores a 10^6 .
- Las enzimas se inactivan fácilmente una vez que se alcanza el grado deseado de transformación.

Diversos estudios han evaluado la utilización de los subproductos acuícolas como fuente de proteínas para producir hidrolizados: Ovissipour, Safari, Motamedzadegan, & Shabanpour

(2012), estudiaron la hidrólisis química y enzimática de vísceras de esturión persa (*Acipenser persicus*), encontrando que los hidrolizados enzimáticos proporcionan mayor extracción de proteína en comparación con los hidrolizados químicos. Por su parte, Silva, Ribeiro, Silva, Cahú, & Bezerra (2014), evaluaron las vísceras y carcasa de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) como fuente de hidrolizados de proteína, encontrando que su composición aminoacídica y el perfil lipídico, les permitía ser usados como fuente de proteínas en dietas para animales de granja. Los estudios realizados por Opheim et al. (2015), sobre la hidrólisis de las vísceras, esqueleto y cabeza de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), mostraron que los hidrolizados a partir de estos subproductos, contiene altos niveles de proteínas, con un alto valor nutricional y potenciales péptidos bioactivos. Wisuthiphaet, Klinchan, & Kongruang (2016) estudiaron la hidrólisis de proteínas provenientes de pez pony (*Eubleekeria splendens*), jurel rayado amarillo (*Selaroides leptolipis*) y caballa (*Decapterus maruadsi*) por métodos químicos (ácido clorhídrico) y enzimáticos (papaína y alcalasa), encontrando que los hidrolizados enzimáticos, especialmente los obtenidos con papaína poseían mejores propiedades nutricionales, debido a un mayor porcentaje de aminoácidos como ácido glutámico, ácido aspártico y lisina.

2.3.1. Hidrólisis enzimática de proteínas

El proceso de hidrólisis enzimática produce la ruptura de los enlaces peptídicos por medio de la acción catalítica de proteasas, consumiéndose una molécula de agua por cada enlace roto, liberando grupos carboxilo y amino, los cuales, pueden estar más o menos ionizados dependiendo del pH de la reacción (Adler-Nissen, 1986), como se muestra en la Figura 2.4.

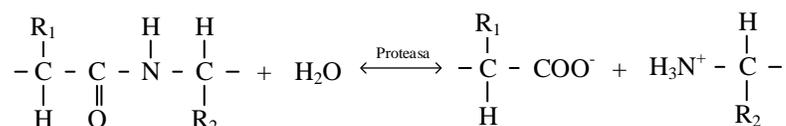


Figura 2.4. Hidrólisis enzimática de un enlace peptídico.

La hidrólisis enzimática disminuye el peso molecular de las proteínas, generando una serie de compuestos intermedios, encerrados en la secuencia primaria de la proteína original, como proteasas y peptonas, liberando finalmente péptidos de menor peso molecular y con

mayor cantidad de grupos ionizables, los cuales poseen propiedades nutricionales, como buena digestibilidad y absorción rápida, además de propiedades funcionales y actividades biológicas mejoradas en comparación a la proteína nativa. Entre las actividades biológicas más importantes están la inhibidora de la ECA (Ketnawa, Suwal, et al., 2018; Thuanthong et al., 2017), antioxidante (Gómez, Gómez, Zapata, et al., 2019; Nikoo et al., 2019), antimicrobianas (Aissaoui et al., 2017; Wald et al., 2016), antitrombóticas (R. Nasri et al., 2012), anticancerígenas (Halim et al., 2018), entre otras. No obstante, existen varios factores generales que determinan el resultado de la hidrólisis enzimática, los cuales se describen a continuación (Wubshet et al., 2019):

A. Parámetros específicos del proceso:

En este grupo de factores, se encuentran las variables que se deben controlar durante el proceso, como la concentración del sustrato, la relación enzima/sustrato, el pH, la temperatura y el tiempo de la reacción. Los primeros cuatro parámetros son los principales determinantes de la rapidez con que se produce la reacción enzimática, es por esto, que es tan importante su optimización. La concentración del sustrato (S) generalmente se da como porcentaje en peso de la proteína total en la mezcla de reacción, sin embargo, esta definición de S puede ser pragmática y no necesariamente indica la concentración de sustrato real, debido a que tanto la proteína original como los péptidos formados inicialmente pueden servir como sustrato para la reacción proteolítica, y generalmente no se puede evaluar un valor exacto de la concentración de sustrato durante la reacción (Adler-Nissen, 1986). Por su parte, la relación enzima/sustrato (E/S), hace referencia a la concentración de enzima en relación con la concentración de sustrato presente en la reacción; y generalmente se expresa como unidades de actividad de la enzima por peso de sustrato. Esta relación se ve afectada por factores como el pH y la temperatura, además de ser más significativa en la velocidad de reacción que la concentración de enzima, debido a que los procesos de hidrólisis de proteínas a menudo se llevan a cabo a concentraciones de sustrato relativamente altas donde prevalece la saturación de sustrato (Adler-Nissen, 1986; Benjakul et al., 2014).

El pH, la temperatura y el tiempo del proceso a menudo se seleccionan en función del objetivo final de la hidrólisis enzimática. Es decir, si se quiere una reacción rápida y con una gran cantidad de enlaces peptídicos hidrolizados, el pH y la temperatura se ajustan a los valores óptimos de trabajo de la enzima, sin embargo, operar cerca de estas condiciones óptimas puede en algunos casos comprometer la estabilidad de ciertas enzimas si la reacción se realiza a tiempos muy largos, donde la tasa de hidrólisis enzimática disminuye y alcanza una fase estacionaria en la que no se produce hidrólisis aparente. Por el contrario, Si el objetivo es una hidrólisis limitada, se recomienda operar lejos de las condiciones óptimas de la enzima, o en concentraciones de enzima significativamente más bajas, para poder detener la reacción de manera más efectiva en grados más bajos de hidrólisis (Kristinsson, 2007).

B. Factores específicos del sustrato:

El sustrato para las enzimas proteolíticas, como su nombre lo indica son las proteínas, las cuales son polímeros de α -aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos, y con una estructura única a la que normalmente se une materia no peptídica, como carbohidratos, lípidos, iones inorgánicos, etc. (Adler-Nissen, 1986). Los sustratos pueden ser tanto de origen animal, como vegetal o bacteriano. Entre los sustratos de origen animal se encuentra la leche, el lactosuero, el huevo, el pescado y sus subproductos, los subproductos de origen bovino tales como plasma, tendones y huesos. Por su parte, se usan como sustratos vegetales las proteínas de soja, trigo, maíz, arroz, champiñones, calabaza, sorgo y amaranto (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008; Sánchez & Vázquez, 2017). Sin embargo, lo más importante es conocer la composición de aminoácidos de la proteína a hidrolizar, ya que de esta dependerá en qué medida y con qué facilidad puede ser hidrolizada la proteína por cierta proteasa; como es el caso de las subtilisinas, las cuales tienen una amplia especificidad, pero con preferencia por los aminoácidos hidrofóbicos (exceptuando la prolina), por lo tanto, es de esperar que las proteínas con un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos se hidrolicen más fácilmente con este tipo de enzimas (Adler-Nissen, 1986).

Generalmente, el sustrato se selecciona de acuerdo con el uso final que se le quiere proporcionar al hidrolizado y al valor agregado que se le dará a aquella proteína de partida (Guadix, Guadix, Páez-Dueñas, González-Tello, & Camacho, 2000). Por ejemplo, si lo que

se desea es obtener hidrolizados con propiedades gelificantes y emulsificantes se suelen emplear colágeno y gelatina por su capacidad para formar geles transparentes. Así mismo, cuando se busca un hidrolizado como fuente de nitrógeno para alimentación animal, se usan proteínas microbianas o provenientes de pescado, o si su finalidad es utilizarse para la preparación de alimentos infantiles o dietas enterales, se usa las proteínas de lactosuero, las cuales son ricas en cisteína (Benítez et al., 2008).

C. Factores específicos de la proteasa:

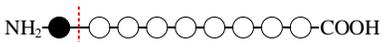
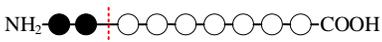
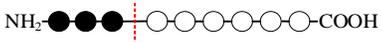
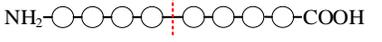
Las enzimas proteolíticas, también conocidas como proteasas o peptidasas, pertenecen al grupo de las hidrolasas, y son las responsables de catalizar la reacción de hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas, con diferentes grados de intensidad y selectividad (Rao, Tanksale, Ghatge, & Deshpande, 1998). Estas se obtienen de diversas fuentes tales como plantas, animales y microorganismos, siendo estos últimos las mejores fuentes para producir proteasas comercialmente viables, especialmente las especies de bacterias *Bacillus*, como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* y especies de hongos *Aspergillus* como *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus* y *A. oryzae* (Singh & Kumar, 2019).

Las proteasas constituyen un grupo amplio y complejo de enzimas, las cuales se diferencian una de la otra, según su especificidad por el sustrato, la naturaleza de sus sitios activos, su mecanismo catalítico, su perfil de estabilidad, su pH y temperatura óptima, siendo fundamental el estudio de estas propiedades, para determinar su aplicación a nivel industrial. Es por lo anterior que, las proteasas no pueden clasificarse con el sistema general de nomenclatura enzimática, por el contrario, estas se clasifican según su acción catalítica, la naturaleza de su sitio activo y su valor de pH óptimo (Tabla 2.2). Cuando se considera su modo de acción catalítica, es decir el sitio de escisión de la cadena peptídica, las proteasas se clasifican en dos grupos (Martínez-Medina et al., 2019):

- a) *Exopeptidasas*: actúan sobre los enlaces peptídicos terminales de la proteína, ya sea en el extremo terminal amino (aminopeptidasa) o carboxilo (carboxipeptidasas), dando como resultado aminoácidos libres.

b) *Endopeptidasas*: actúan en los enlaces peptídicos internos de la proteína, generando cadenas peptídicas cortas.

Tabla 2.2. Clasificación de Proteasa, de “Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases” por Rao et al., 1998.

Proteasa	Modo de acción*	No. EC**
Exopeptidasas		
<i>Aminopeptidasas</i>		3.4.11
Dipeptidil peptidasa		3.4.14
Tripeptidil peptidasa		3.4.14
<i>Carboxipeptidasa</i>		3.4.16–3.4.18
Serina proteasa		3.4.16
Metaloproteasa		3.4.17
Cisteína proteasa		3.4.18
Peptidil dipeptidasa		3.4.15
Dipeptidasas		3.4.13
Endopeptidasas		
		3.4.21–3.4.34
Serina proteasa		3.4.21
Cisteína proteasa		3.4.22
Aspártico proteasas		3.4.23
Metaloproteasa		3.4.24
Endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido		3.4.99

* Círculos blancos representan los residuos de aminoácidos en la cadena de polipéptidos y los negros indican los aminoácidos terminales. Las líneas rojas muestran los sitios de acción de la enzima.

** Número de la Comisión Enzimática

De igual manera, estas se dividen en cuatro subgrupos según el grupo funcional en el sitio activo (Rao et al., 1998):

- 1) *Serina proteasas*: se caracterizan por la presencia de un grupo serina en su sitio activo. Son numerosas y se extienden entre virus, bacterias y eucariotas, lo que sugiere que son vitales para los organismos. Estas proteasas son generalmente activas a pH neutro y alcalino, con un pH óptimo entre pH 7 y 11, con puntos isoeléctricos entre pH 4 y 6. Con pesos moleculares que oscilan entre 18 y 35 kDa. Además, tienen amplias especificidades por sustrato, incluyendo actividad esterolítica y amidasa.
- 2) *Aspártico proteasas*: las proteasas de ácido aspártico, comúnmente conocidas como proteasas ácidas, son las que dependen de los residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica. La mayoría muestran una actividad máxima a pH bajo (pH 3 a 4), y con pesos moleculares en el rango de 30 a 45 kDa. Las fuentes más conocidas de este tipo de proteasas son el estómago (para pepsina, gastricina y quimosina), lisosomas (para catepsinas D y E), riñón (para renina), gránulos de levadura y hongos (para proteasas secretadas como rizopuspepsina, penicillopepsina y endotiapepsina).
- 3) *Cisteína proteasas*: su actividad depende de una díada catalítica que consiste en cisteína e histidina. En general, estas enzimas son activas solo en presencia de agentes reductores como HCN o cisteína, y tienen su actividad máxima a pH neutro, aunque algunas de ellas, por ejemplo, proteasas lisosomales, son máximamente activas a pH ácido. A este grupo pertenece la papaína, siendo la cisteína la proteasa más conocida.
- 4) *Metaloproteasas*: su principal característica es que requieren iones metálicos divalentes para su actividad. Incluyen enzimas de diversos orígenes, como colagenasas de organismos superiores, toxinas hemorrágicas de venenos de serpiente y termolisina de bacterias.

En cuanto a la clasificación de las proteasas de acuerdo con su rango de pH óptimo, estas se pueden clasificar en proteasas alcalinas, neutras y ácidas. Las proteasas ácidas poseen su mayor actividad entre pH 2 y 6, y están generalmente constituidas entre 380 a 420 aminoácidos, y diferentes residuos de aminoácidos constituyen el sitio activo, perteneciendo principalmente a este grupo las aspártico proteasas, algunas cisteína proteasas y metaloproteasas. Las proteasas neutras, como su nombre lo indica, tienen una actividad

óptima a valores de pH cercanos a la neutralidad, en esta clasificación se incluyen las cisteína proteasas, metaloproteasas y algunas serina proteasas. Finalmente, las proteasas alcalinas tienen una alta actividad entre pH 8 a 13 y contienen aproximadamente de 420 a 480 residuos de aminoácidos su cadena, siendo las serina proteasa las más representativas de este grupo (Martínez-Medina et al., 2019).

Entre las proteasas más comúnmente usadas para producir hidrolizados de proteínas de pescado, se encuentran las derivadas de microorganismos, como Alcalasa® 2.4L, Neutrasa® 0.5L, Flavourzima® y Protamex™; las derivadas de plantas, como papaína y bromelina, y por último las de fuentes animales, como pepsina, tripsina y pancreática (Chalamaiah et al., 2012; Guerard, 2007). Entre ellas, la Alcalasa® 2.4L (subtilisina Carlsberg: EC 3.4.21.14), una serina proteasa alcalina producida a partir de *Bacillus licheniformis*, ha sido la más utilizada para la obtención de hidrolizados de proteína de pescado, debido a que se ha encontrado que se obtiene altos grados de hidrólisis en comparación con otras proteasas, generándose hidrolizados ricos en péptidos de cadena corta, que generalmente presentan actividades biológicas como antioxidante, antihipertensiva y antiinflamatoria, que pueden ser resistentes a las enzimas digestivas (Abdelhedi & Nasri, 2019; Kristinsson & Rasco, 2000a; Sarmadi & Ismail, 2010). Además, esta endopeptidasa, posee una amplia especificidad para romper enlaces peptídicos, prefiriendo los residuos de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos (Abdelhedi & Nasri, 2019; Benjakul et al., 2014). De igual forma, desde un punto de vista técnico y económico, la alcalasa al tener su actividad óptima a pH alcalino, es más eficiente en la hidrólisis de proteínas de pescado, además de tener la mejor relación costo/actividad enzimática en comparación con el resto de proteasas (Bhaskar, Benila, Radha, & Lalitha, 2008; Saadi, Saari, Anwar, Hamid, & Mohd Ghazali, 2015).

Algunas investigaciones sobre la hidrólisis de proteínas de pescado con alcalasa, han demostrado que dicha proteasa presenta alta actividad en un rango de pH entre 6,5 a 8,5 y un rango de temperatura entre 50 a 70 °C (Bhaskar et al., 2008; Ishak & Sarbon, 2017; Jamil, Halim, & Sarbon, 2016; Ovissipour, Abedian Kenari, Motamedzadegan, & Nazari, 2012; Saidi, Belleville, Deratani, & Amar, 2013). Sin embargo, en un estudio más exhaustivo de la hidrólisis enzimática de subproductos de merluza del pacífico (*Merluccius productus*) con

Alcalasa® 2.4L realizado por Benjakul & Morrissey (1997), se encontró que dicha enzima presentó una pérdida considerable de actividad a un pH de 10,5 pero que permanecía activa aun a pH 6. Por su parte, Da Rocha et al. (2018), estudiaron las actividades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes de los hidrolizados enzimáticos de corvina argentina (*Umbrina canosai*) usando alcalasa y protamex, encontrando que los hidrolizados con alcalasa (GH 20%) tuvieron una mayor actividad de captación de radicales ABTS, quelación de metales y poder antioxidante férrico reductor (FRAP), además de tener una influencia considerable sobre la actividad antibacteriana, pero que ambos hidrolizados disminuyeron la capacidad pro-inflamatoria. Liu et al. (2014), investigaron el efecto del tipo de enzima (alcalasa y protamex) en las propiedades estructurales y funcionales de los hidrolizados de subproductos de surimi, reportando que los hidrolizados obtenidos con protamex (GH 10%) contenían péptidos más grandes que los hidrolizados con alcalasa, sin embargo, ambos hidrolizados aumentaron la solubilidad de las proteínas en más del 65%.

2.3.2. Medición de la extensión de la hidrólisis enzimática de proteínas

Para controlar la cinética de reacción de la hidrólisis enzimática y obtener una medida de su extensión, se emplea el parámetro denominado grado de hidrólisis (GH), más comúnmente usado para describir la hidrólisis de proteínas alimentarias, debido a que es más simple y rápido de controlar (Kristinsson & Rasco, 2000a). Este se define como la relación porcentual del número de enlaces peptídicos rotos durante la hidrólisis (h) sobre el número total de los enlaces peptídicos de la proteína nativa (h_{tot}) y ambos pueden ser expresados como meq/g de proteína o como mmol/g de proteína. h_{tot} puede ser determinado a partir de la composición de aminoácidos de la proteína (Adler-Nissen, 1986):

$$GH(\%) = \frac{h}{h_{tot}} \cdot 100 \quad (2.1)$$

Se han utilizado varios métodos analíticos, para monitorear, comprender y optimizar el porcentaje de GH, entre estos se encuentran los métodos clásicos como pH-stat, ácido trinitro-bencenosulfónico (TNBS), orto-ftaldialdehído (OPA), titulación de formol y

nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA), los cuales se basan en diferentes principios para medir enlaces peptídicos rotos. Aunque, actualmente también se ha venido empleando con menor frecuencia una serie de métodos como electroforesis, calorimetría, espectroscopía de RMN e infrarroja (Wubshet et al., 2019). No obstante, el método de pH-stat es el más comúnmente usado, debido a su practicidad y a su facilidad para monitorear y controlar el grado de hidrólisis en tiempo real (Adler-Nissen, 1986; Kristinsson & Rasco, 2000a). El método de pH-stat es relativamente simple y se basa en mantener constante el pH durante la reacción, por medio de la adición de una solución básica de concentración conocida, para neutralizar los H⁺, liberados en la reacción. Así, el GH se calcula en función del número de protones (grupos α-amino) liberados durante la hidrólisis, estimado a partir de las moles de base consumida, según la ecuación (2.2) (Adler-Nissen, 1986; Guadix et al., 2000). Sin embargo, esto no es necesariamente una medición directa de los enlaces peptídicos escindidos, ya que muchos factores, como la naturaleza de la enzima utilizada, el tamaño de los péptidos hidrolizados y la temperatura de reacción influirán en las mediciones (Wubshet et al., 2019).

$$\text{GH}(\%) = \frac{V_B \cdot N_B}{M_P \cdot h_{tot} \cdot \alpha} \cdot 100 \quad (2.2)$$

Donde V_B (mL) es el volumen consumido de base durante la reacción, N_B (meq/mL) es la normalidad de la base, M_P es la masa de la proteína (g), α es el grado de disociación promedio de los grupos α-NH liberados en la hidrólisis. La ecuación (2.2) solo es válida cuando la hidrólisis se realiza a un pH superior al pK del grupo α-NH (pH superiores a 7,5). En estas condiciones, la reacción dará como resultado una liberación neta de protones (H⁺) cuando los enlaces peptídicos se corten y el consumo de base será proporcional al número de enlaces peptídicos divididos (Adler-Nissen, 1986). Sin embargo, por encima de pH 6,5, la disociación del grupo α-NH protonado se vuelve significativa, por lo tanto, es importante conocer los valores de pK de los grupos α-NH, tanto para determinar el pH de la reacción como para calcular la constante de disociación correctamente.

Otro de los métodos utilizados para medir el GH durante la hidrólisis enzimática es la titulación de formol, que al igual que el método del pH-stat, se basa en el número de protones

liberados, medidos por la cantidad de base gastada en la titulación. Pero difieren en el principio básico, ya que la titulación de formol se basa en una reacción entre un grupo amino y formaldehído, como se muestra en la Figura 2.5. Esta reacción se presenta tanto en pH neutro como alcalino, dando como resultado la liberación de protones y una reducción concurrente del valor de pKa del aminoácido – formaldehído producido. Esta titulación se puede realizar por dos técnicas diferentes, la directa o la indirecta. En la técnica directa, se agrega formaldehído directamente a la solución de muestra antes de realizar la valoración con la base. En la técnica indirecta, la solución de muestra se ajusta primero al pH antes de agregar el formaldehído, sin embargo, la técnica directa da mejores resultados en términos de reproducibilidad (Wubshet et al., 2019).

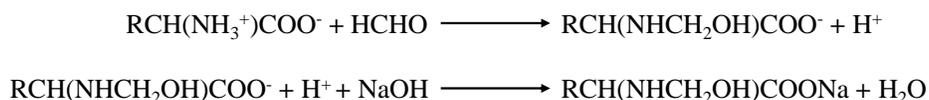


Figura 2.5. Reacción entre un aminoácido y formaldehído en presencia de hidróxido de sodio.

Para la medición del GH, también existen métodos espectrofotométricos como el TNBS y el OPA, los cuales se basan en la medición de los grupos α -amino liberados, por medio de su derivatización con ácido trinitro-bencenosulfónico (Figura 2.6) o con orto-ftaldialdehído (Figura 2.7), respectivamente, y así permitir su detección en el rango ultravioleta-visible para el método TNBS o fluorescente para el caso del OPA. El valor de absorbancia obtenido se convierte luego en valores cuantitativos mediante el uso de una curva estándar preparada con un aminoácido libre, generalmente leucina, calculándose el GH, como la proporción porcentual de la cantidad del aminoácido liberado en el hidrolizado con respecto a la cantidad del aminoácido de la proteína completa (Adler-Nissen, 1979; Nielsen, Petersen, & Dambmann, 2001). Sin embargo, en estos métodos, los reactivos de derivatización exhiben reactividad diferente hacia algunos aminoácidos, afectando la precisión de la medición. Por ejemplo, en el caso del método OPA no será exacto cuando se aplique en hidrolizados ricos en prolina y cisteína (Wubshet et al., 2019).

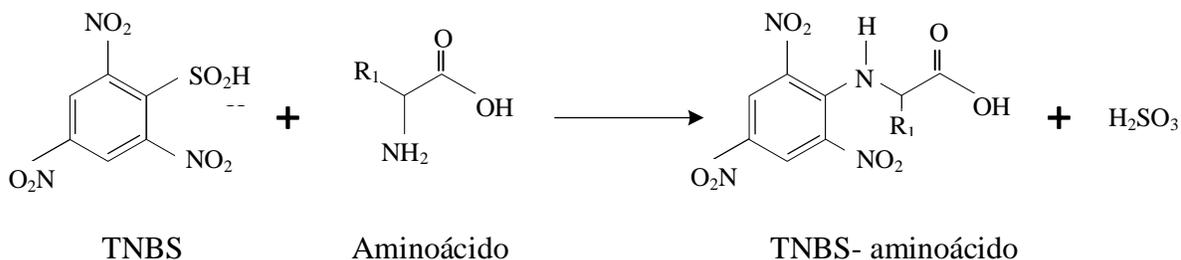


Figura 2.6. Reacción de TNBS con grupos amino.

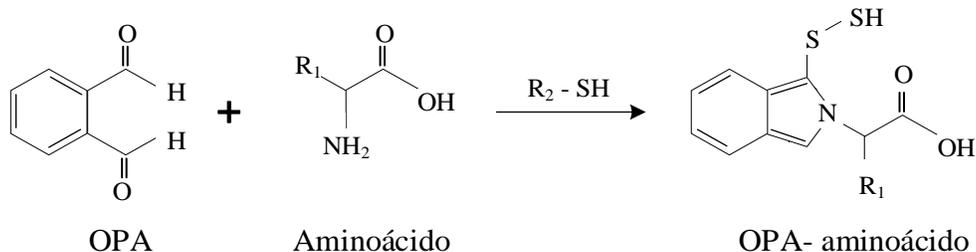


Figura 2.7. Reacción de OPA con grupos amino.

Por último, se encuentra el método del nitrógeno soluble en ácido tricloroacético o índice de solubilidad en ácido tricloroacético, también utilizado para estimar el GH. Este no es un método que detecta la cantidad de enlaces peptídicos escindidos, por el contrario, mide la cantidad de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético, suponiendo que proviene exclusivamente de aminoácidos y péptidos pequeños. El valor del índice de solubilidad del ácido tricloroacético se determina precipitando la proteína no hidrolizada con ácido tricloroacético, seguido de centrifugación. Así, el índice de nitrógeno soluble en TCA del hidrolizados se expresa como la proporción porcentual del contenido de nitrógeno del sobrenadante y del contenido en la muestra original (Aluko, 2018).

Aunque los métodos discutidos anteriormente proporcionan las herramientas para monitorear los cambios ocurridos durante la hidrólisis enzimática, la comparación entre los valores de GH obtenidos mediante cada uno de ellos debe realizarse con precaución, debido a que cada método emplea diferentes principios de medición y por lo tanto los resultados van a variar. Generalmente, los valores de GH obtenidos por el método del pH-stat son más bajos que los determinados por TNBS y OPA (Wubshet et al., 2019), lo cual puede deberse a una

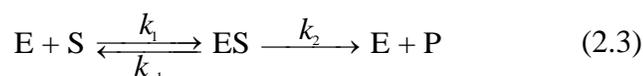
subestimación del valor de pK de los grupos α -amino, ocasionando una sobreestimación en el grado de disociación (α) y por ende en una subestimación del GH (ecuación 2.2.) (Adler-Nissen, 1986). A su vez, los valores de GH obtenidos por el método TCA, son más altos que los reportados por métodos TNBS y OPA, lo que se debe principalmente a que la muestra de inicial (hidrolizado) ya está digerida y contiene altos contenidos de péptidos solubles (Aluko, 2018).

2.3.3. Modelado cinético de la hidrólisis enzimática de proteínas

La hidrólisis enzimática de proteínas es un proceso complejo debido a la cantidad de factores que influyen en ella, tales como (Qi & He, 2006; Sierra, Sepúlveda, Vásquez, Figueroa, & Zapata, 2018; Trusek-Holownia, 2008; Valencia et al., 2015):

- i) Naturaleza y calidad del sustrato: la diversidad de aminoácidos que conforman los enlaces peptídicos, haciendo casi imposible detectarlos usando solamente la concentración de sustrato como variable.
- ii) Sustratos presentes en la reacción: los péptidos generados pueden actuar como nuevos sustratos, dando como resultado una hidrólisis progresiva.
- iii) Tipos de reacción: algunos enlaces peptídicos se rompen en paralelo y otros en secuencia, todas las reacciones presentándose de forma simultánea.
- iv) Sistemas heterogéneos: principalmente cuando se hidrolizan fracciones musculares y porciones de grasas insolubles, como es el caso de la hidrólisis de subproductos acuícolas.
- v) Inhibiciones presentadas tanto por el sustrato como por el producto e inactivación térmica de la enzima durante la reacción.
- vi) Factores exógenos: tales como pH, temperatura y fuerza iónica, los cuales actúan sobre la velocidad de reacción.

Aunque los factores anteriores hacen difícil un modelado fenomenológico del proceso de hidrólisis, es posible emplear la cinética simple de Michaelis-Menten, la cual ha sido utilizada en este tipo de procesos, donde la velocidad de reacción depende sólo de la concentración de sustrato (Apar & Özbek, 2009; Qu et al., 2015; Trusek-Holownia, 2008). En este caso, la reacción enzimática generalmente se modela como un proceso de dos pasos: unión de sustrato (S) con enzima (E) y formación de un complejo enzima-sustrato (ES), seguido de una descomposición irreversible del complejo enzima-sustrato para liberar enzima y producto (P) (Adler-Nissen, 1986):



El modelo de Michaelis-Menten se basa en varias suposiciones, tales como: i) un equilibrio rápido entre los reactivos (E + S) y el complejo ES, seguido de una conversión más lenta del complejo ES a enzima libre y producto ($k_2 \ll k_1$); ii) la concentración de sustrato permanece constante durante la reacción, dado que generalmente la concentración inicial de sustrato es mucho más alta que la concentración total de enzima y iii) la concentración del complejo enzima-sustrato permanece constante en el tiempo, aplicándose el principio de estado pseudo – estacionario (Copeland, 2013). Durante el estado pseudo - estacionario, la velocidad de formación del producto (v), puede calcularse mediante la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S] + K_m} \quad (2.4)$$

Donde, K_m conocida como constante de Michaelis-Menten, es la concentración del sustrato que proporciona una velocidad de reacción igual a la mitad de la velocidad máxima (V_{max}) obtenida en condiciones de saturación, es decir, es la concentración de sustrato a la que la mitad de los sitios activos de la enzima se encuentran ocupados (saturados) de moléculas de sustrato en el estado estacionario. El término V_{max} se refiere a la velocidad máxima obtenida a una concentración de sustrato infinita, y esta puede definirse matemáticamente como se observa en la ecuación 2.5 (Copeland, 2013):

$$V_{max} = k_2 \cdot [E] \quad (2.5)$$

Siendo k_2 o algunas veces llamada k_{cat} la constante de velocidad catalítica, propiedad fundamental de la enzima. Esta algunas veces se denomina como número de rotación de la enzima (*turnover number*), ya que define la cantidad de eventos de rotación catalítica que ocurren por unidad de tiempo, siendo por lo tanto expresada en unidades tiempo recíproco (por ejemplo, min^{-1} , s^{-1}) (Illanes, Altamirano, & Wilson, 2008). K_m y V_{max} son conocidos como los parámetros cinéticos, los cuales se determinan experimentalmente para obtener expresiones de velocidad validadas para el diseño o la evaluación del rendimiento de la hidrólisis enzimática (Illanes et al., 2008). Sus valores pueden determinarse directamente ajustando una gráfica de velocidad inicial en función de la concentración de sustrato (Figura 2.8) a la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 2.4).

La forma general de la curva de saturación es la de una hipérbola rectangular (Figura 2.8). A bajas concentraciones de sustrato ($S \ll K_m$), la velocidad de la reacción (v) es proporcional a la concentración de sustrato (S), en esta región, la reacción de hidrólisis enzimática es de primer orden con respecto a la concentración del sustrato. Para el caso donde S es mucho mayor que K_m , es decir, a concentraciones de sustrato más altas, la velocidad de la reacción permanece aproximadamente constante y sin variaciones a los cambios en la concentración del sustrato. En esta región, el orden de las reacciones de hidrólisis enzimática es de orden cero con respecto al sustrato (Marangoni, 2002). Aunque el modelo de Michaelis-Menten sirve de base para el estudio de la hidrólisis enzimática de proteínas, este desconoce en ocasiones la complejidad asociada al empleo de sustratos múltiples altamente complejos, como el caso de matrices alimentarias en las que intervienen múltiples proteínas (Sierra et al., 2018). Además, de no tener en cuenta la inhibición por producto, inhibición por sustrato y la inactivación térmica de la enzima para el modelado de la cinética enzimática (Qi & He, 2006; Valencia et al., 2014).

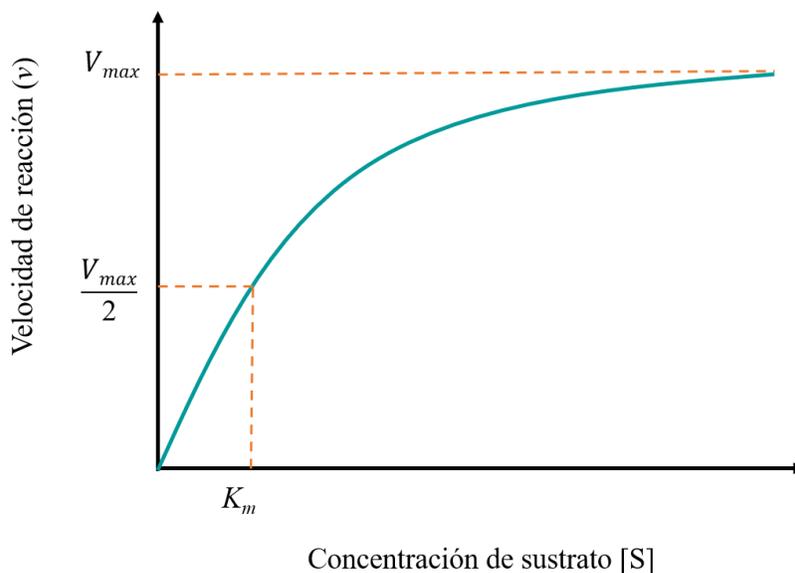


Figura 2.8. Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten (Curva de Saturación).

Una característica importante de las reacciones de hidrólisis enzimática es la interacción con sustancias diferentes al sustrato, lo cual conduce a una alteración de los parámetros cinéticos. Estas sustancias, conocidas como inhibidores, se definen como cualquier ligando que se une al enzima reversible o irreversiblemente, esta última condición también denominada inactivación, ocasionando una disminución en la velocidad de reacción o bloqueando completamente la capacidad catalítica de un enzima (Copeland, 2013). En la inhibición irreversible, el inhibidor se une de forma covalente a la enzima, modificándola y sin posibilidad de regeneración. Por su parte, en el caso de la inhibición reversible, al eliminar el inhibidor la enzima recupera su actividad normal (Lehninger, Nelson, & Cox, 2013). Esta última a su vez puede dividirse en tres tipos (Tabla 2.3):

Tabla 2.3. Tipos de inhibición de de “Lehninger Principles of Biochemistry” por Lehninger et al, 2013.

Tipo de inhibición	Mecanismo
<p>Competitiva:</p> <p>El inhibidor (I) compite con el sustrato por el sitio activo de la enzima. Muchos inhibidores competitivos son estructuralmente similares al sustrato y se combinan con la enzima para formar un complejo EI, pero sin conducir a la catálisis. La evidencia experimental es el aumento en el K_m.</p>	
<p>Acompetitiva:</p> <p>En este caso el inhibidor se une exclusivamente al complejo ES, no presenta afinidad por la enzima libre. Su efecto en la cinética enzimática es decrecer tanto el valor de K_m como el de V_{max}.</p>	
<p>No competitiva (mixta):</p> <p>El inhibidor no compite con el sustrato por el sitio activo de la enzima. Tanto el inhibidor como el sustrato se unen al enzima formando un complejo terciario. El efecto aparente que tiene en la reacción enzimática es la disminución de V_{max} sin afectar el K_m.</p>	

2.3.4. Procesos de purificación de hidrolizados enzimáticos de proteínas

Los hidrolizados enzimáticos de proteína contiene una mezcla muy compleja de numerosos péptidos con diferentes secuencias de aminoácidos, tamaños moleculares, hidrofobicidad, cargas netas y actividades biológicas. Se ha identificado que las fracciones con pesos moleculares entre 1 a 4 kDa son la opción más prometedora para fines nutricionales y farmacéuticos de mayor valor agregado (Abdelhedi & Nasri, 2019; Abejón et al., 2018; Li-Chan, 2015). Por lo tanto, se han desarrollado métodos de separación y purificación, como las técnicas cromatográficas y de membrana, para aislar efectivamente fracciones de péptidos con un rango más estrecho de propiedades fisicoquímicas y funcionales (Abejón et al., 2018; Aluko, 2018; Li-Chan, 2015). Algunos de estos métodos sirven como fase inicial para la producción de fracciones peptídicas más activas, la purificación de péptidos y la posterior identificación de la secuencia de aminoácidos. No obstante, en algunos casos la separación de péptidos no siempre garantiza una mayor actividad en comparación con el hidrolizado original (Aluko, 2018).

2.3.4.1. Tecnología de separación por membrana

El principio general de este tipo de separación es la permeabilidad selectiva de la membrana para permitir que las sustancias de interés penetren a través de ella, en el caso de hidrolizados de proteína, los péptidos son separados en función de su peso molecular. Los procesos basados en membrana generalmente funcionan a temperatura ambiente y no hay cambios de fase ni reacciones químicas en el proceso, por lo que es especialmente adecuado para la separación y purificación de sustancias bioactivas termosensibles (Ren et al., 2013). Actualmente, para el fraccionamiento de hidrolizados de proteína se usa membranas tanto de ultra como de nanofiltración, sin embargo las membranas de ultrafiltración son las más utilizadas para fraccionar péptidos, así como para la eliminación de proteínas y otras macromoléculas. Las membranas están hechas principalmente de polisulfona o derivados de celulosa, las primeras proporcionan una alta rigidez, pero un ensuciamiento rápido debido a su hidrofobicidad, por el contrario, las membranas de celulosa por su característica hidrofílica poseen un menor ensuciamiento, pero baja resistencia química y mecánica. Los tamaños de las membranas están disponibles comercialmente según el peso molecular de corte (MWCO),

y estos pueden variar entre 500 Da hasta 100 kDa (Aluko, 2018; Martínez-Maqueda, Hernández-Ledesma, Amigo, Miralles, & Gómez-Ruiz, 2013). Se han reportado diversas investigaciones sobre el impacto de esta tecnología en los péptidos de hidrolizados de diferentes subproductos de pescado (Tabla 2.4), encontrándose que, para la obtención de péptidos con un tamaño molecular deseado, con una propiedad funcional y/o actividad determinada, es necesario utilizar una serie de membranas con diferentes pesos moleculares de corte.

Tabla 2.4. Purificación de hidrolizados de subproductos de pescado con tecnología de membranas

Tipo de membrana	Peso molecular de corte	Especie	Subproducto	Referencia
Ultra y nanofiltración	1 - 4 kDa	Atún	Residuos del procesamiento del atún enlatado	Abejón et al. (2018)
Ultrafiltración	5 - 10 kDa	Tilapia roja (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Cabeza, esqueleto y cola	Roslan, Mustapa Kamal, Md. Yunos, & Abdullah (2017)
Ultrafiltración	1 kDa	Tilapia del nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Piel	Thuanthong et al. (2017)
Ultrafiltración	1, 5 y 10 kDa	Bacalao (<i>Gadus macrocephalus</i>)	Piel	Ngo, Vo, Ryu, & Kim (2016)
Ultrafiltración	<1 kDa	Bacalao (<i>Gadus morhua</i>)	Esqueleto	Girgih et al. (2015)
Ultra y nanofiltración	1 - 4 kDa	Atún	Músculo oscuro	Saidi, Deratani, Belleville, & Amar (2014)

2.3.4.2. Técnicas de separación cromatográficas

Las técnicas de cromatografía líquida son las más utilizadas para el fraccionamiento de proteínas, más específicamente HPLC es usado para compuestos bioactivos. Esta separación se logra de acuerdo con su carga, hidrofobicidad, tamaño o especificidad, y en algunos casos también se pueden utilizar para eliminar algunas sustancias de interferencia (por ejemplo, sales) provenientes de etapas de previas (Martínez-Maqueda et al., 2013; Saadi et al., 2015). Existen diversas técnicas cromatográficas utilizadas en la separación y purificación de hidrolizados de subproductos de pescado (Tabla 2.5), entre las más utilizadas se encuentra la cromatografía de intercambio iónico (IEC), la cual separa los péptidos en función de su capacidad de carga. Los péptidos cargados positivamente se fraccionan por cromatografía de intercambio aniónico, mientras que los cargados negativamente se fraccionan por cromatografía de intercambio catiónico.

Tabla 2.5. Técnicas cromatográficas para purificación de hidrolizados de subproductos de pescado

Método cromatográfico*	Especie	Subproducto	Referencia
IEC - SEC - RP HPLC	Atún barrilete (<i>K. pelamis</i>)	Cabeza	Zhang et al. (2019)
SEC - RP HPLC	Lenguado (<i>Platichthys flesus</i>)	Músculo	Ko et al. (2016)
IEC - SEC - RP HPLC	Pez aleta azul (<i>Navodon septentrionalis</i>)	Cabeza	Chi, Wang, Wang, Zhang, & Deng (2015)
SEC - RP HPLC	Pez Pintarroja (<i>Scyliorhinus canicula</i>)	Músculo, vísceras, piel y esqueleto	García-Moreno, Espejo-Carpio, Guadix, & Guadix (2015)
IEC - RP HPLC	Salmón (<i>Salmo sp.</i>)	Aleta	Ahn, Kim, & Je (2014)
SEC - RP HPLC	Pez cabeza de serpiente (<i>Channidae sp.</i>)	Músculo	Ghassem, Babji, Said, Mahmoodani, & Arihara (2014)

*IEC: cromatografía de intercambio iónico, SEC: cromatografía de exclusión molecular,

RP-HPLC: cromatografía líquida de alta presión en fase reversa.

Una de las técnicas más usadas es la cromatografía líquida en fase reversa (RP-LC), la cual separa los péptidos de acuerdo con su hidrofobicidad. Los péptidos menos hidrófobos

no se unirán o se unirán débilmente en una fase estacionaria y eluirán en el primer grupo de picos, por el contrario, los péptidos altamente hidrofóbicos se unirán muy fuertemente y requerirán un gradiente más fuerte de la fase móvil para eluirse en el grupo de péptidos de liberación tardía (Aluko, 2018). Finalmente, se encuentra la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), más precisamente el modo de filtración en gel, donde los péptidos y las proteínas se separan de acuerdo con su peso molecular. En este caso, los péptidos con tamaños más grandes que el tamaño de partícula de la columna no podrán ingresar al gel y eluirán más rápido. En contraste, los péptidos más pequeños entrarán en las partículas de la columna, lo que retarda su paso, prolonga la permanencia en la columna y garantiza tiempos de elución más largos (Aluko, 2018; Saadi et al., 2015).

2.4. Propiedades bioactivas de los hidrolizados de proteínas de subproductos acuícolas

Los hidrolizados enzimáticos de proteínas de pescado, se caracterizan por ser una de las fuentes más importante de péptidos, los cuales son responsables de conferirle sus propiedades bioactivas, estos se definen como una secuencia de aminoácidos con longitudes que varían generalmente entre 2 a 20 unidades de aminoácidos y que están encriptados e inactivos en las proteínas originales, pero que pueden ser liberados a través de diferentes métodos, incluida la hidrólisis enzimática (Martínez-Medina et al., 2019; Petrova et al., 2018). Los péptidos pueden exhibir diferentes propiedades bioactivas, tales como: antihipertensiva, antioxidante, antimicrobiana, antitrombótica, anticancerígena, etc. (Benjakul et al., 2014; Kristinsson & Rasco, 2000a; Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Todo ello dependiendo de las características del péptido, como secuencia y composición de aminoácidos, tamaño, hidrofobicidad y carga (Arshad, Siow, Ngoh, Sofian, & Gan, 2019; Martínez-Medina et al., 2019; Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Gracias a sus actividades biológicas, los péptidos son moléculas de gran importancia para el desarrollo de agentes terapéuticos, ya que estos proporcionan un impacto positivo en las funciones del cuerpo humano, protegiéndolo de diferentes trastornos, infecciones y enfermedades (Ananey-Obiri, Matthews, & Tahergorabi, 2019), además de tener diversas ventajas en comparación con los medicamentos tradicionales, tales como un amplio espectro de acción, alta bioespecificidad y menos alergenicidad (Agyei et al., 2016; Arshad et al., 2019).

2.4.1. Propiedades antioxidantes

El estrés oxidativo es un desequilibrio redox, que ocurre cuando la capacidad antioxidante de una célula se ve alterada por una sobre producción especies reactivas del oxígeno (ROS). Las ROS son una clase de radicales libres que se forman con oxígeno, tales como radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$), peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$) y anión superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), que contienen uno o más electrones orbitales desapareados, haciéndolos inestables y muy reactivos con otras moléculas o sustancias para formar compuestos más estables con un estado de energía más bajo, provocando así lesiones celulares o tisulares. Se ha sugerido que las ROS y por ende el estrés oxidativo, participan en el inicio y/o propagación de enfermedades crónicas tales como: cardiovasculares, inflamatorias, cáncer y diabetes (Ananey-Obiri et al., 2019; S.-K. Kim et al., 2012; Xiong, 2010).

Las reacciones oxidativas también pueden deteriorar las cualidades sensoriales y nutricionales de los alimentos, debido a la oxidación de lípidos y proteínas, lo cual puede ocurrir tanto durante el procesamiento, como durante el almacenamiento. Para prevenir estas reacciones de oxidación existen en la industria alimentaria y farmacéutica, gran variedad de antioxidantes sintéticos como el hidroxitolueno butilado (BHT), el hidroxianisol butilado (BHA), la butil hidroquinona terciaria (TBHQ) y el galato de propilo (PG). Sin embargo, el uso de estos antioxidantes sintéticos ocasiona riesgos potenciales para la salud, haciendo importante la búsqueda de antioxidantes naturales como alternativas seguras (Chalamaiah et al., 2012; S.-K. Kim et al., 2012). Es este el caso de las proteínas y los péptidos bioactivos derivados de los hidrolizados enzimáticos de subproductos acuícolas, los cuales pueden utilizarse en las industrias alimentarias y farmacéuticas como antioxidantes potenciales con beneficios para la salud (S.-K. Kim et al., 2012).

Los antioxidantes son sustancias químicas que pueden prevenir, inhibir o captar los radicales libres. Estos tienen un papel fundamental en la reducción de los procesos oxidativos tanto en el cuerpo humano como en los sistemas alimentarios (Ananey-Obiri et al., 2019; Samaranyaka & Li-Chan, 2011). En los alimentos, los antioxidantes son utilizados para retardar la peroxidación de lípidos, y por ende la formación de productos secundarios de dicha reacción, con el fin de mantener el sabor, la textura y el color de los alimentos durante

el almacenamiento. Además, los antioxidantes también reducen la oxidación de proteínas, así como la interacción de estas con los carbonilos derivados de los lípidos, evitando una alteración de la funcionalidad de las proteínas (Le Gouic, Harnedy, & FitzGerald, 2018; Samaranayaka & Li-Chan, 2011). Actualmente, los antioxidantes naturales como la vitamina C, los tocoferoles, los extractos de hierbas y los hidrolizados de proteínas y péptidos derivados de fuentes como la leche, la soja, el huevo y el pescado, se han comercializado como alternativas a los antioxidantes sintéticos en los sistemas alimentarios (Samaranayaka & Li-Chan, 2011).

En el cuerpo humano, los antioxidantes ayudan a proteger los tejidos y órganos del daño oxidativo causado por las ROS. Para esto, existe una serie de antioxidantes presentes en las células humanas, llamados antioxidantes endógenos, como por ejemplo las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, y diversos compuestos no enzimáticos como el selenio, el α -tocoferol y la vitamina C. Además de estos, los aminoácidos, péptidos y proteínas también contribuyen a la capacidad antioxidante de las células y al mantenimiento de la salud de los tejidos biológicos (Le Gouic et al., 2018). Algunos ejemplos de aminoácidos con propiedades antioxidantes son histidina, cisteína, metionina y tirosina, y los de péptidos antioxidantes como glutatión, carnosina y anserina (Gianfranceschi, Gianfranceschi, Quassinti, & Bramucci, 2018; Mada, Ugwu, & Abarshi, 2019; L. Zhang et al., 2019). Sin embargo, una proteólisis extensiva de las proteínas produce una disminución de la actividad antioxidante, por lo tanto, los aminoácidos libres generalmente no son tan efectivos como antioxidantes, en comparación con los péptidos, que gracias a sus propiedades químicas y físicas los hacen más estables (Samaranayaka & Li-Chan, 2011). El equilibrio antioxidante-prooxidante en el cuerpo humano puede cambiar con la edad y por factores como la contaminación ambiental, el estrés, el consumo excesivo de calorías y las dietas altas en grasas (Samaranayaka & Li-Chan, 2011; Xiong, 2010).

En general, los péptidos antioxidantes son cortos, con cadenas entre 2 a 10 residuos de aminoácidos, que incluyen residuos hidrofóbicos (valina y leucina) y/o prolina, histidina, triptófano, tirosina, metionina y cisteína en sus secuencias (Ananey-Obiri et al., 2019). Estos son capaces de actuar a través de tres mecanismos químicos, como captadores de radicales

libres, extinción del oxígeno singlete y/o agentes quelantes de iones metálicos. Los péptidos como captadores de radicales libres pueden reducir la oxidación de lípidos, proteínas y ADN al inhibir la fase de iniciación (antioxidantes preventivos) o al inhibir la fase de propagación (antioxidantes que rompen la cadena). La extinción del oxígeno singlete, implica la transferencia de energía del $^1\text{O}_2$ al antioxidante o una agregación de $^1\text{O}_2$ a los endoperóxidos formadores de antioxidantes. En cuanto al mecanismo de quelación de iones metálicos, los péptidos inhiben la actividad de los metales de transición con dos o más estados de valencia, como el hierro y el cobre (Jensen, Eilertsen, Mæhre, Elvevoll, & Larsen, 2013). De igual forma, los péptidos antioxidantes pueden actuar por medio de interacciones físicas, formando membranas que evitan el contacto directo entre lípidos y radicales libres, como se muestra en la Figura 2.9.

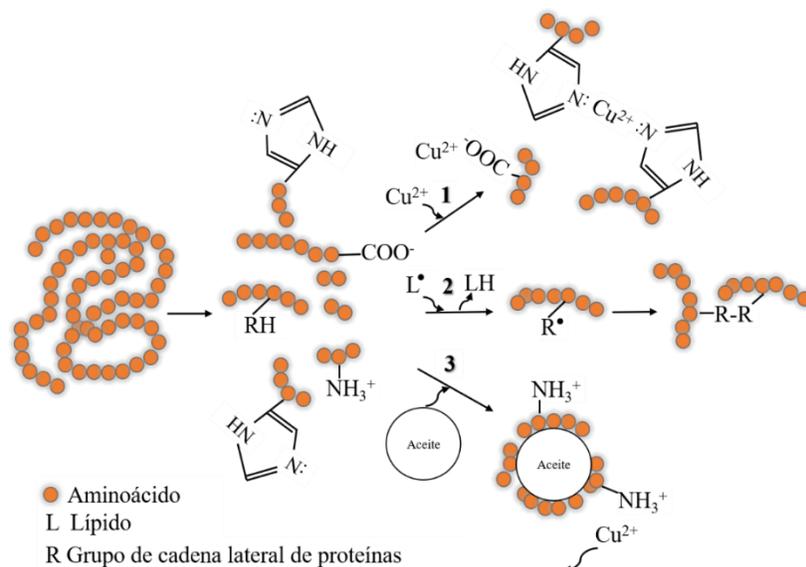


Figura 2.9. Esquema de los mecanismos químicos y físicos de los péptidos antioxidantes para inhibir los procesos oxidativos. (1) quelación de metales; (2) captación de radicales; (3) interacción física (blindaje; repulsión), de "Antioxidant peptides" por Xiong, 2010.

Se han utilizado varios métodos para controlar y comparar la actividad antioxidante de proteínas y péptidos, los cuales se pueden dividir en ensayos químicos y biológicos *in vitro*, ensayos *in vivo* en modelos animales y experimentos clínicos en humanos. Los métodos químicos se basan principalmente en el mecanismo de inactivación involucrado, y se pueden dividir en dos categorías: transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y ensayos basados en

transferencia de electrones (SET) (Jensen et al., 2013; S.-K. Kim et al., 2012). Los ensayos basados en HAT determinan la capacidad de un antioxidante (AH) para extinguir los radicales libres (ROO•) mediante la donación de un átomo de hidrógeno (H), formando compuestos más estables (AO•), y así detener las reacciones en cadena de los radicales (Sveinsdottir, Hamaguchi, Bakken, & Kristinsson, 2014), como se muestra en la Figura 2.10. En general, los ensayos HAT implican un generador de radicales libres sintéticos, una sonda oxidable y el antioxidante de interés, y su cuantificación se realiza a partir de curvas cinéticas de la reacción competitiva, reflejando más estrechamente los ensayos *in vivo* (Jensen et al., 2013).



Figura 2.10. Mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno (HAT)

Por su parte, los ensayos basados en el mecanismo SET detectan la capacidad de un antioxidante (AH) de transferir electrones a un radical libre (ROO•) y así ayudar en la reducción de cualquier compuesto, incluidos metales, carbonilos y radicales (Figura 2.11). Estos ensayos involucran solo dos componentes en la reacción: una sonda oxidante y el antioxidante de interés. La capacidad antioxidante se determina de acuerdo con el grado del cambio de color de la sonda reducida (Sveinsdottir et al., 2014).

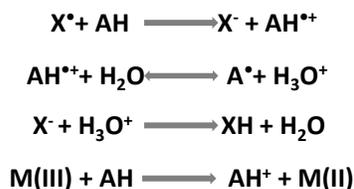


Figura 2.11. Mecanismo transferencia de electrones (SET)

Estos métodos *in vitro* difieren entre sí en términos de reactivos, estándares, pH y métodos de cuantificación, por lo que es difícil comparar los resultados entre ellos, en la Tabla 2.6 se muestra las mayores diferencias entre dichos métodos y los ensayos empleados. Ahora bien, debido a la complejidad de los procesos oxidativos que se producen en los sistemas alimentarios o biológicos, así como a los diferentes mecanismos por los que puede actuar un antioxidante, encontrar un método que pueda caracterizar el potencial antioxidante

general no es fácil, por lo tanto, se considera conveniente realizar varios ensayos que abarquen los dos métodos *in vitro* para determinar la capacidad antioxidante de los péptidos e hidrolizados de proteínas (Jensen et al., 2013; Samaranyaka & Li-Chan, 2011).

Tabla 2.6. Comparación de ensayos basados en HAT y SET, de “Health Effects of Antioxidative and Antihypertensive Peptides from Marine Resources” por Jensen et al, 2013.

Método	Ensayos	Tiempo de reacción	Tiempo de Ensayo	Resultado
HAT	ORAC, TRAP, TOSC*, CAA, Inhibición de la oxidación de LDL, CBA, DPPH**, ABTS**.	Relativamente rápido y completado en segundos o minutos.	Mayor tiempo de análisis, debido a que monitorean la cinética de reacción.	Tomados de la curva cinética.
SET	FRAP, DPPH**, CUPRAC, ABTS**.	Relativamente lento y necesita de varios minutos para completarse.	Poco tiempo de análisis	Basados en cambios de color o disminución relativa del porcentaje en el producto.

*Capacidad total de eliminación de oxirradical.

**Ensayos en modo mixto: depende del tamaño y la polaridad de los compuestos que reaccionan y el pH del medio.

Actualmente, el interés en el desarrollo de antioxidantes a partir de proteínas de pescado, más específicamente a partir de los subproductos generados durante su procesamiento, ha ido aumentando, debido a que se consideran fuentes ricas de compuestos bioactivos estructuralmente diversos y con diferentes actividades biológicas (Ngo, Wijesekara, Vo, Van Ta, & Kim, 2011). Además, el aprovechamiento de este tipo de subproductos a través de la bioconversión en productos de alta calidad como los hidrolizados de proteínas y péptidos con actividades biológicas, reduce la contaminación y el costo económico asociado con el tratamiento de los desechos generados (Abuine, Rathnayake, & Byun, 2019). Diversos autores han reportado actividad antioxidante en hidrolizados de proteínas y péptidos de subproductos de pescado, como se muestra en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7. Actividad Antioxidantes de hidrolizados de proteínas de subproductos de pescado

Especie	Subproducto	Enzima	Actividad Antioxidante	Referencia
Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	Piel	Protamex	DPPH: 56,64 ± 1,32% FRAP: 3,37 ± 0,04 µM Trolox/ mg hidrolizado Quelante de metales: 43,07 ± 2,16% ABTS: ~ 1200 µmol Trolox/ g	Tkaczewska, Jamroz, Kulawik, Morawska, & Szczurowska (2019)
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Cabeza, vísceras, aletas y esqueleto	Alcalasa	FRAP: ~ 200 µmol Trolox/ g Quelante de metales: ~ 70 µmol EDTA/ g ABTS: 1530,8 ± 40,7 µmol Trolox/ g	Nikoo et al. (2019)
Tilapia roja (<i>Oreochromis spp.</i>)	Vísceras	Alcalasa	ORAC: 1125,8 ± 33,1 µmol Trolox/ g CBA: 49,8 ± 1,9 % FRAP: 548,9 ± 42,4 µmol Trolox/ g	Gomez et al. (2019)
Bonito (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	Vísceras	Alcalasa 2.4L	DPPH: ~ 40% ABTS: ~ 98% Quelante de metales 57,04%	Klomklao & Benjakul (2018)
Bacalao (<i>Gadus macrocephalus</i>)	Piel	Tripsina Alcalasa Flavourenzima	Quelante de metales 12,7 ± 0,3% con tripsina 6,2 ± 0,6% con alcalasa ~ 9% con flavourenzima	Wu, Li, Hou, Zhang, & Zhao (2017)
Baga japonesa (<i>Nemipterus japonicus</i>)	Esqueleto	Papaina (HP) Bromelina (HB)	DPPH: HB 90%; HP 60% Inhibición de la peroxidación lipídica del ácido linoleico HB ~ 70%; HP ~ 62%	Gajanan, Elavarasan, & Shamasundar (2016)

2.4.2. Propiedades antihipertensivas

La hipertensión es una enfermedad que presenta elevación crónica de la presión arterial; excediendo 140/90 mmHg (presión sistólica por encima de 140 mmHg o presión diastólica por encima de 90 mmHg). Siendo uno de los principales factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, como aterosclerosis, enfermedad coronaria, arteriopatía periférica, accidente cerebrovascular o infarto de miocardio y enfermedad renal. La Organización Mundial de la Salud (2014), informo que para el año 2012, se presentaron 17,5 millones de muertes a nivel mundial debido a enfermedades cardiovasculares y que alrededor de 7,4 millones se debieron a ataques cardíacos y 6,7 millones a accidentes cerebrovasculares, convirtiéndose en una de las principales causas de muerte a nivel global (Arshad et al., 2019; Martínez-Medina et al., 2019). Sin embargo, la regulación de la presión arterial es compleja e involucra varias vías metabólicas entrelazadas, entre las que se encuentran el sistema renina-angiotensina, el sistema cinina-óxido nítrico, el sistema de endopeptidasa neutra, el sistema de enzimas convertidoras de endotelina, el sistema nervioso simpático y los mecanismos de equilibrio de riñones y líquidos (Norris, Harnedy, & FitzGerald, 2014).

Las vías de control de la presión arterial más estudiadas con respecto a los péptidos derivados de fuentes pescado involucran a aquellas que inhiben la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y/o la renina (Figura 2.12) (Abdelhedi & Nasri, 2019; Norris et al., 2014). Estas enzimas tienen un rol crucial en la regulación de la presión arterial a través de los sistemas renina-angiotensina y quinina-óxido nítrico. En el sistema renina-angiotensina, la renina, una aspartil proteasa producida principalmente en el riñón, es responsable de la conversión del angiotensinógeno en el deca-péptido angiotensina I. El nivel de renina en la sangre cambia con la alteración de la presión sanguínea y el equilibrio de líquidos, determinando así la actividad general del sistema renina-angiotensina. Del mismo modo, la ECA, una dicarboxipeptidasa presente en el torrente sanguíneo, convierte la angiotensina I en el octa-péptido y potente vasoconstrictor, angiotensina II, al eliminar el dipéptido His-Leu del extremo C-terminal. La presencia de angiotensina II desencadenará la secreción de aldosterona de las glándulas suprarrenales, lo que da como resultado un aumento de la reabsorción de sal y agua, así como un aumento de la presión arterial (Arshad et al., 2019;

Lafarga & Hayes, 2017). En el sistema cinina-óxido nítrico, la ECA inactiva el péptido vasodilatador bradicinina, la cual, además se une a los receptores que conducen a un aumento eventual en el nivel intracelular de Ca^{2+} , estimulando la generación de óxido nítrico a partir de L-arginina (Gallego, Mora, & Toldrá, 2018; Norris et al., 2014).

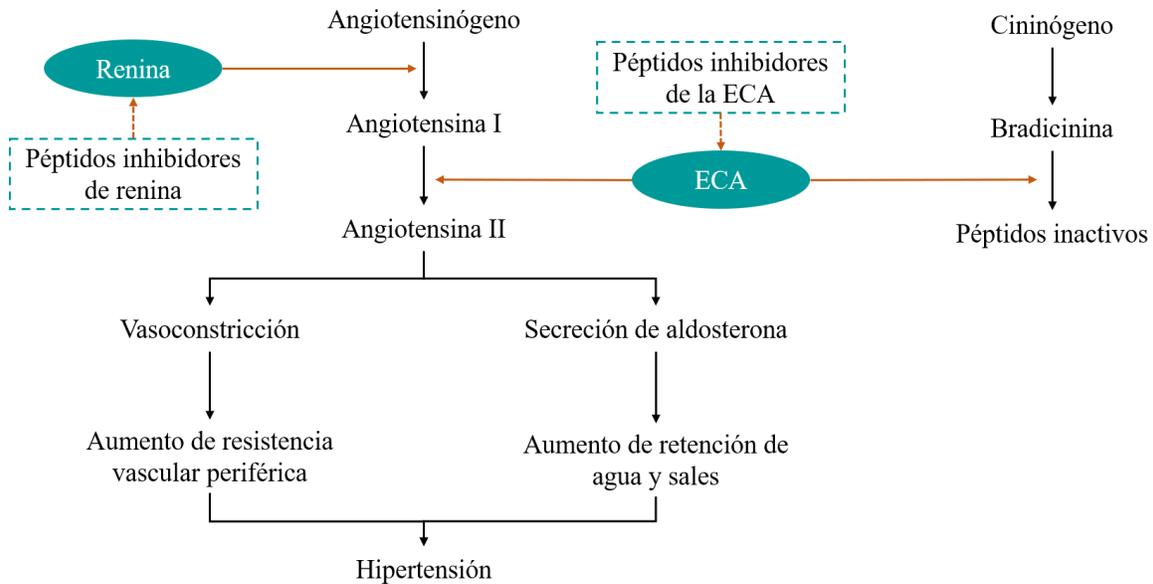


Figura 2.12. Sistema renina-angiotensina y péptidos antihipertensivos derivados de pescado, Tomado y modificado de “Bioactive Peptide of Marine Origin for the Prevention and Treatment of Non-Communicable Diseases” por Pangestuti & Kim, 2017.

Actualmente, existe una variedad de compuestos sintéticos para el tratamiento de la hipertensión, los cuales poseen diferentes características, como bloqueadores de los canales de calcio, diuréticos, vasodilatadores directos, bloqueadores de los receptores de angiotensina II e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y renina (Norris et al., 2014; Sear, 2019). Siendo estos últimos los más estudiados, ya que sirven como primera línea de defensa para sujetos hipertensos. Entre estos medicamentos sintéticos, se encuentran Captopril, Enalapril, Lisinopril, Ramipril y Aliskiren, sin embargo, este tipo de medicamentos inhibidores están asociados con diferentes efectos secundarios, que incluyen tos, erupciones cutáneas, hipotensión, pérdida del gusto, angioedema, función renal reducida y anomalías fetales (Abdelhedi & Nasri, 2019; Sear, 2019). Por todo lo anterior, ha

aumentado el interés por compuesto de origen natural como los péptidos inhibidores de la ECA y/o renina derivados de fuentes animales y vegetales, más específicamente inhibidores de la ECA obtenidos de hidrolizados de proteínas y péptidos provenientes del pescado y sus subproductos (Abdelhedi & Nasri, 2019; Pangestuti & Kim, 2017).

Los péptidos inhibidores de la ECA a partir de fuentes de pescado se identificaron por primera vez en musculo de sardina en el año 1986 (Zeng, Zhao, Liu, & Dong, 2013). Desde entonces, se han encontrado péptidos inhibidores de la ECA en hidrolizados de proteínas de diversas especies de pescado como se muestra en la Tabla 2.8, los cuales se caracterizan por ser péptidos de cadena corta, con una extensión entre 2 a 10 unidades de aminoácidos y con residuos de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos como triptófano, tirosina, prolina y fenilalanina (Lafarga & Hayes, 2017; Martínez-Medina et al., 2019; Matsui & Tanaka, 2010). Estos péptidos pueden actuar de manera competitiva, no competitiva o acompetitiva, sin embargo, la mayoría de los obtenidos a partir de fuentes de pescado actúan como inhibidores competitivos o no competitivos para la ECA. La inhibición competitiva, se basa en bloquear la ECA al ocupar sus sitios activos, de modo que el sustrato ya no se une al sitio activo. Mientras que el mecanismo no competitivo, los péptidos son capaces de combinarse con la enzima fuera de su sitio de unión, para producir un complejo inhibidor, incapaz de catalizar el sustrato, independientemente de si la molécula del sustrato ya se ha unido o no (Abdelhedi & Nasri, 2019; Pangestuti & Kim, 2017; Zeng et al., 2013).

Se han utilizado varios métodos o modelos para determinar los efectos antihipertensivos de las proteínas y péptidos inhibidores de la ECA, que incluyen ensayos *in vitro* estáticos y dinámicos, cultivos celulares y estudios en animales para evaluar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de péptidos antihipertensivos antes de estudios clínicos adicionales para demostrar su efecto hipotensor en humanos (Gallego et al., 2018). Entre los ensayos *in vitro*, se han utilizado métodos espectrofotométricos, fluorométricos, radioquímicos, cromatográficos (HPLC) y electroforéticos (electroforesis capilar), así como varios sustratos para medir la actividad inhibidora de la ECA, siendo los más utilizados los péptidos sintéticos hipuril-histidil-leucina (HHL) y furanacriloil-fenilalanilglicil-glicina (FAPGG), pero se pueden emplear otros péptidos (Jensen et al., 2013; Zeng et al., 2013).

Tabla 2.8. Actividad inhibidora de la ECA de hidrolizados de proteínas de subproductos de pescado

Especie	Subproducto	Enzima	Actividad inhibidora de la ECA	Referencia
Granadero (<i>Macrourus spp.</i>)	Piel y esqueleto	Alcalasa	IC ₅₀ : 361,1 ± 39,3 µg/mL	Vazquez et al. (2019)
	Cabeza		IC ₅₀ : 195,6 ± 20,7 µg/mL	
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Esqueleto	Alcalasa	IC ₅₀ : 0,015 mg/mL	Ketnawa et al. (2018)
Tilapia del Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Piel	Alcalasa	IC ₅₀ : 1,20 mg/mL	Thuanthong et al. (2017)
Tilapia roja (<i>Oreochromis spp.</i>)	Cabeza, esqueleto y cola	Alcalasa	71,83 ± 5,07% (5 kDa)	Roslan et al. (2017)
Musola (<i>Mustelus mustelus</i>)	Visceras	Esperasa®	IC ₅₀ : 164,56 ± 2,6 µg/mL	Abdelhedi et al. (2017)
Bacalao (<i>G. macrocephalus</i>)	Piel	Pepsina	91%	Ngo et al. (2016)
		Pepsina	IC ₅₀ : 1,26 mg/mL	
Lenguado (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	Músculo	Papaina	IC ₅₀ : 2,14 mg/mL	Ko et al. (2016)
		Tripsina	IC ₅₀ : 1,47 mg/mL	
		Kojizyme	IC ₅₀ : 2,85 mg/mL	

2.4.3. Propiedades anticoagulantes

La coagulación de la sangre se inicia unos segundos después de una lesión vascular, respuesta fisiológica llamada hemostasia. Su objetivo principal es sellar el vaso lesionado, mediante la agregación de plaquetas en el sitio de la lesión (hemostasia primaria), para luego estabilizarlas mediante la formación de una red de fibrina (hemostasia secundaria). Este mecanismo no solo previene la pérdida de sangre sino que también desencadena la cicatrización de heridas y la regeneración de tejidos (Capurso & Capurso, 2020; Wahed, Quesada, & Dasgupta, 2020). Tradicionalmente, la hemostasia en su fase secundaria se ha dividido en tres vías distintas: intrínseca, extrínseca y común (Figura 2.13), las cuales conforman la cascada de coagulación. En estas intervienen una serie de reacciones complejas que involucran plaquetas y la activación de proteínas sanguíneas específicas, conocidas como factores de coagulación. Estos factores de coagulación son generalmente enzimas serina proteasas, con la excepción de los Factores V (FV) y VIII (FVIII), que son glucoproteínas, y FXIII, que es una transglutaminasa, los cuales circulan como zimógenos (precursores enzimáticos) inactivos. Tanto la vías intrínseca como la extrínseca finalmente se fusionan en la vía común, lo que conduce a la formación de trombina, seguida de la formación de monómeros de fibrina y su oligomerización (Capurso & Capurso, 2020; Yan, Xu, Vogler, & Siedlecki, 2018).

La hemostasia normal es un equilibrio entre los mecanismos procoagulantes y anticoagulantes del organismo, que se presenta gracias a fuerzas tromboresistentes que involucran proteínas anticoagulantes para controlar la formación de coágulos y proteínas fibrinolíticas para eliminar el coágulo una vez que se ha reparado una lesión vascular. No obstante, cuando existe un desequilibrio entre estos componentes, el sistema hemostático a veces no puede degradar los coágulos de fibrina, lo que conduce a la obstrucción del flujo sanguíneo y en última instancia, a la trombosis (Levy, Sniecinski, & Welsby, 2019; Syed & Mehta, 2018). La trombosis puede ocurrir tanto en la circulación arterial como en la venosa, siendo la trombosis arterial aguda la causa de la mayoría de los casos de ataque cardíaco y de aproximadamente el 80% de los accidentes cerebrovasculares, por su parte el

tromboembolismo venoso es la tercera causa principal de muerte asociada a enfermedades cardiovasculares (Mackman, 2008).

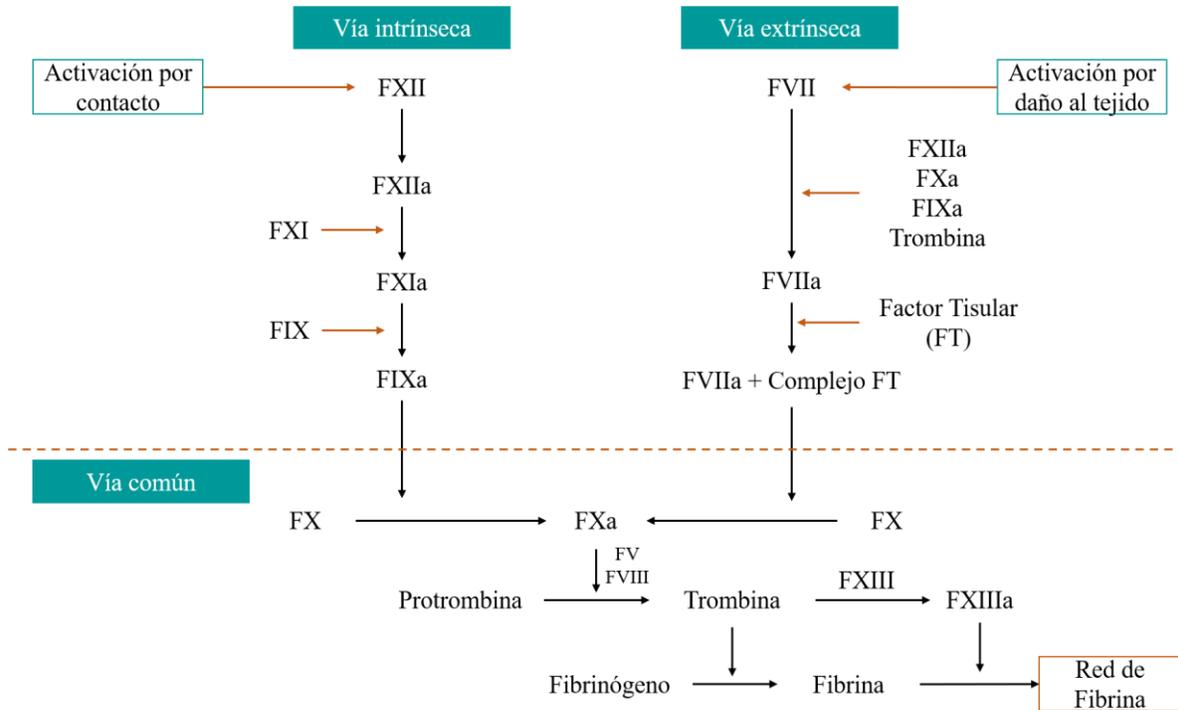


Figura 2.13. Diagrama simplificado de la cascada de coagulación. Tomada y modificada de “*Hemostasis and Thrombosis*” por Capurso & Capurso, 2020.

Para tratar este tipo de patología se usan agentes antitrombóticos, los cuales se dividen en anticoagulantes y agentes antiplaquetarios, esto dependiendo del tipo de trombosis a tratar. Los anticoagulantes son utilizados para prevenir y tratar la trombosis venosa, actuando sobre las proteínas de la cascada de coagulación. Los más comúnmente utilizados son la heparina no fraccionada, las heparinas de bajo peso molecular y los antagonistas de la vitamina K, como la Warfarina, los cuales pueden prolongar el tiempo de coagulación entre 1,5 a 4 veces con respecto a un control, dependiendo de la dosis y concentraciones utilizadas (Bozic Mijovski, 2019; Gray, Mulloy, & Barrowcliffe, 2008; X. Liu et al., 2018; Wahed et al., 2020). Sin embargo, aunque son eficaces, estos anticoagulantes sintéticos están relacionados con algunos efectos secundarios como, el desarrollo de trombocitopenia y la activación de la respuesta inmune en pacientes con uso a largo plazo. Por su parte, los agentes

antiplaquetarios, como ácido acetilsalicílico y el clopidogrel previenen y tratan la trombosis arterial, pero están asociados con algunos efectos secundarios que incluyen sangrado gastrointestinal y aumento de la reactividad plaquetaria (Indumathi & Mehta, 2016; Mackman, 2008; M. Nasri, 2017; Ngo, Vo, & Kim, 2013). Por lo todo lo anterior, se hace necesario el desarrollo de agentes anticoagulantes naturales y específicos, con menores efectos secundarios, que representen una alternativa diferente a los anticoagulantes tradicionales comerciales.

Los anticoagulantes más frecuentemente aislados de fuentes marinas incluyen macromoléculas como polisacáridos, proteoglicanos y proteínas, pero debido a su tamaño molecular, se hace difícil la absorción por el sistema gastrointestinal (Indumathi & Mehta, 2016). No obstante, los péptidos de bajo peso molecular son especialmente efectivos en términos de costo, restricción conformacional, permeabilidad de la membrana y estabilidad metabólica (Syed & Mehta, 2018). Se han descrito varios mecanismos por los cuales los péptidos bioactivos podrían ejercer su actividad anticoagulante y/o antitrombótica. Uno de ellos es por medio de la interacción que presentan con la trombina (o factores de coagulación) inhibiendo su actividad proteolítica sobre el fibrinógeno. Otro mecanismo, está relacionado con la unión de los péptidos anticoagulantes con monómeros de fibrina ya formados y por lo tanto, previniendo su polimerización (M. Nasri, 2017). Sin embargo, a pesar de las características benéficas que pueden presentar los péptidos como compuestos anticoagulantes, rara vez se han aislado de hidrolizados enzimáticos de subproductos de pescado (Tabla 2.9), siendo necesario más estudios para identificarlos, aislarlos y aclarar el mecanismo relacionado con su efecto anticoagulante (Benjakul et al., 2014; M. Nasri, 2017; Ngo et al., 2013; Saadi et al., 2015).

Para determinar la actividad anticoagulante de proteínas y péptidos derivados de hidrolizados de subproductos de pescado se utiliza los ensayos de tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), tiempo de protrombina (PT) y tiempo de trombina (TT), en los cuales los resultados de prolongación del tiempo de coagulación se comparan con los tiempos encontrados con el control o con un anticoagulante comercial, como la heparina (S.-K. Kim & Wijesekara, 2010; Saadi et al., 2015). El ensayo de APTT, evalúa la vía de coagulación

intrínseca y común, mediante la medición del tiempo en el que el péptido anticoagulante retrasa la activación de los factores XII, XI, X, IX y VIII, necesarios para la formación del activador intrínseco de la protrombina y fibrinógeno. Por su parte, el ensayo PT evalúa el tiempo en el que el anticoagulante retrasa la activación de la protrombina, factor V, VII y X presentes en la vía de coagulación extrínseca y común. Finalmente, el tiempo de trombina (TT) mide la formación de fibrina causada por la acción de la trombina, en el último paso en la cascada de la coagulación (Wahed et al., 2020).

Tabla 2.9. Actividad anticoagulante de proteínas marinas

Especie	Producto	Actividad Anticoagulante	Referencia
Gobio (<i>Zosterisessor ophiocephalus</i>)	Hidrolizado enzimático de músculo	TT a 20 mg/mL Alcalasa: 45,8 s NH1: 58,2 s A21: 52,2 s A1: 49,1 s A26: > 60 s	R. Nasri et al. (2012)
Mejillón (<i>Mytilus edulis</i>)	Extracto purificado de músculo	TT: 81,3 ± 0,8 s APTT: 321 ± 2,1 s	Jung & Kim (2009)
Lombriz de mar (<i>Urechis uncinatus</i>)	Extracto purificado	APTT: 192,8 ± 2,1 s	Jo, Jung, & Kim (2008)
Limanda (<i>Limanda aspera</i>)	Hidrolizado enzimático de esqueleto	APTT: ~ 150 s a 4 μM	Rajapakse, Jung, Mendis, Moon, & Kim (2005)

2.5. Bioaccesibilidad de los péptidos bioactivos de los hidrolizados de proteínas de subproductos acuícolas

Para que los péptidos bioactivos ejerzan efectos beneficiosos sobre la salud, deben primero ser absorbidos en el intestino delgado, ya sea en su forma intacta o en otros fragmentos activos. Sin embargo, dicha absorción puede ser afectada por varios factores

inherentes a la digestión gastrointestinal (GI), como la acción de las enzimas proteolíticas y el pH degradante, especialmente en el estómago, lo cual puede modificar las características estructurales de los péptidos y, por lo tanto, alterar su bioactividad (Abdelhedi & Nasri, 2019; Gallego et al., 2018; Liao, Jahandideh, Fan, Son, & Wu, 2018; M. Nasri, 2017). No obstante, la estabilidad de los péptidos bioactivos en el tracto gastrointestinal también va a depender de su composición de aminoácidos, tamaño molecular, carga y solubilidad (Pangestuti & Kim, 2017; Xu, Hong, Wu, & Yan, 2019). Así, los péptidos de bajo peso molecular, al ser tan pequeños no pueden actuar como sustratos de las proteasas digestivas, haciéndolos más resistentes a la digestión GI, lo que les permite pasar en su forma intacta y alcanzar el torrente sanguíneo (Pangestuti & Kim, 2017). En particular, los dipéptidos y tripéptidos se absorben más fácilmente a través de la membrana del trato gastrointestinal que las proteínas y los aminoácidos libres (Abdelhedi & Nasri, 2019; Norris et al., 2014; Xu et al., 2019). En el caso de la composición de aminoácidos, se ha encontrado que los péptidos que contienen prolina e hidroxiprolina son más resistentes a la degradación por las enzimas digestivas (FitzGerald & Meisel, 2000; Ohara, Matsumoto, Ito, Iwai, & Sato, 2007), y los que contienen cisteína leucina, metionina, prolina, valina o isoleucina muestran una alta permeabilidad (Xu et al., 2019).

Se han desarrollado varios modelos para evaluar y cuantificar tanto la bioaccesibilidad (modelos de digestión GI *in vitro*, cultivos celulares), como la biodisponibilidad (modelos *in vivo* en animales y clínicos) de los péptidos bioactivos (Gallego et al., 2018; Jones, Caballero, & Davidov-Pardo, 2019). En la Tabla 2.10, se muestra las principales ventajas y desventajas de cada uno de estos modelos. La bioaccesibilidad se puede definir como la cantidad o fracción que se libera del péptido en el tracto gastrointestinal y que está disponible para su absorción; esto incluye las transformaciones digestivas del péptido, la absorción/asimilación en las células del epitelio intestinal y, el metabolismo pre-sistémico (tanto intestinal como hepático). Esta generalmente se evalúa mediante modelos de digestión GI *in vitro*, seguido de modelos de absorción en células Caco-2, los cuales se emplean como primer paso para la evaluación de la bioactividad antes de realizarse los estudios en animales y en humanos (Carbonell-Capella, Buniowska, Barba, Esteve, & Frígola, 2014; Galanakis, 2017; Tamer & Çopur, 2016). De manera diferente, el término biodisponibilidad incluye en su definición la

utilización de un nutriente y, por lo tanto, puede definirse como la fracción del compuesto ingerido que alcanza la circulación sistemática y se utiliza, esta incluye digestión GI, absorción, metabolismo, distribución de tejidos y efecto de la bioactividad del péptido. Es por esto, que cuando se habla de biodisponibilidad, se debe demostrar que el componente analizado se digiere y asimila de manera eficiente y luego, una vez absorbido, ejerce un efecto positivo sobre la salud humana. La biodisponibilidad es posible determinarla por medio de modelos *in vivo* en animales o estudios clínicos (Carbonell-Capella et al., 2014; Galanakis, 2017; Tamer & Çopur, 2016).

Tabla 2.10. Ventajas y desventajas de los principales modelos usados para evaluar la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad

Modelo	Ventajas	Desventajas
Digestión GI <i>In vitro</i>	Económico, rápido y sin restricciones éticas	Solo puede evaluar la bioaccesibilidad y no la biodisponibilidad
Cultivos celulares	Rápido y sin restricciones éticas. Evalúa la permeabilidad real de las células epiteliales.	No incorpora condiciones del tracto gastrointestinal. Solo puede evaluar la absorción
Estudios en animales	Menos costoso que los estudios clínicos. Posibilidad de realizar estudios de toxicología.	No siempre es posible correlacionar los resultados con ensayos en humanos. Más costoso que los estudios <i>in vitro</i> o celulares. Restricciones éticas
Estudios clínicos	Método más preciso.	Altamente costosos, con restricciones éticas. No apto para estudios de toxicología

2.5.1. Modelos de digestión gastrointestinal *in vitro*

La digestión GI *in vitro* es una herramienta simple y útil para evaluar y predecir la bioaccesibilidad de los péptidos bioactivos, ya que posee una alta reproducibilidad, condiciones controladas de operación y fácil muestreo (Jones et al., 2019; Minekus et al., 2014). Los métodos de digestión GI simulada típicamente incluyen la fase oral, gástrica e

intestinal (intestino delgado), y ocasionalmente la fermentación en el intestino grueso (Figura 2.14). Estos métodos intentan imitar las condiciones fisiológicas *in vivo*, teniendo en cuenta la presencia de enzimas digestivas en sus respectivas concentraciones, pH, tiempo de digestión y concentraciones de sales, entre otros factores (Minekus et al., 2014). Aunque, estos modelos no representan todos los aspectos dinámicos del proceso gastrointestinal, muestran muy buenas correlaciones con los resultados *in vivo* incluso en el caso de alimentos complejos que pueden estar sujetos a cambios estructurales debido al ambiente digestivo (Gallego et al., 2018).

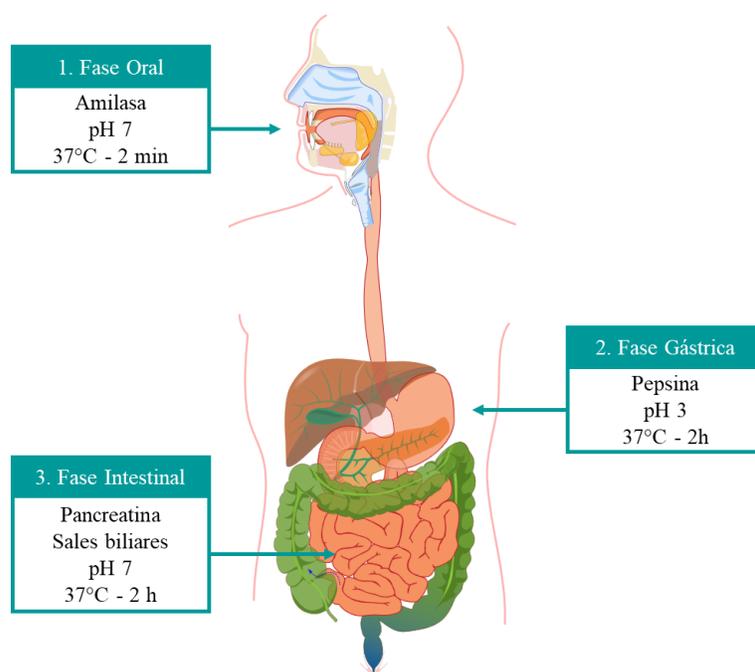


Figura 2.14. Modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*.

Se han publicado pocos estudios sobre el efecto y la estabilidad de los péptidos bioactivos de los hidrolizados de proteínas de subproductos acuícolas después de la digestión GI *in vitro*. No obstante, Ketnawa, Wickramathilaka, & Liceaga (2018), evaluaron el efecto de la digestión GI sobre la estabilidad de los péptidos antioxidantes, obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática de espinas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa 2.4®L, encontrando que después de la digestión gastrointestinal simulada, los péptidos disminuyeron en cuanto al peso molecular (<1800 Da) y aumentaron su capacidad

antioxidante de captación de radicales ABTS. Por su parte, Wong et al. (2019) analizaron la estabilidad de los péptidos antioxidantes WAFAPA (661,32 Da) and MYPGLA (650,30 Da) derivados y purificados de la hidrólisis enzimática de la especie marina mantarraya azul (*D. kuhlii*), hallando que el péptido MYPGLA conservó su actividad antioxidante luego de la digestión GI in vitro, contrario a lo que se encontró con el péptido WAFAPA el cual disminuyó su capacidad antioxidante, los autores atribuyen este comportamiento a una degradación del péptido por las enzimas digestivas gastrointestinales.

2.5.2. Modelos celulares Caco-2

Los péptidos bioactivos después del proceso de las enzimas gastrointestinales deben resistir las peptidasas de los enterocitos y pasar a través del epitelio intestinal para ser finalmente absorbidos. Un modelo celular ampliamente aceptado para imitar dicha absorción de los péptidos en el intestino delgado son las células Caco-2 aisladas del adenocarcinoma colorrectal humano (Jones et al., 2019; Liao et al., 2018; Xu et al., 2019). Las células Caco-2 sufren espontáneamente la diferenciación enterocítica cuando son sembradas sobre membranas semipermeables, un proceso relacionado con el crecimiento. En las primeras etapas del cultivo (3 a 4 días), las células permanecen indiferenciadas, mostrando solo unas pocas microvellosidades apicales, pero una vez que llegan a la confluencia (14 a 21 días), forman monocapas polarizadas con microvellosidades apicales bien desarrolladas (Pereira, Costa, Sarmiento, & Araújo, 2016). Esta monocapa celular divide los lados apical y basolateral de la absorción (Figura 2.15), el péptido a analizar se introduce en el lado apical y el resto absorbido se recoge en el lado basolateral en los intervalos de tiempo deseados. El porcentaje de analito que se absorbe a través de las células Caco-2 se determina mediante análisis analíticos (Jones et al., 2019). A pesar de su origen colónico, las células Caco-2 expresan la mayoría de las características morfológicas y funcionales de las células intestinales absorbentes, incluidas las enzimas como las disacaridasas y peptidasas típicamente expresadas por los enterocitos. Sin embargo, la enzima metabolizadora más importante en el intestino humano (CYP3A4), es baja o ausente en las células Caco-2, sobreestimando la fracción absorbida por los sustratos a 3A4 (Pereira et al., 2016).

Existen algunos estudios sobre la absorción intestinal de péptidos bioactivos derivados de hidrolizados de proteínas de subproductos acuícolas, entre ellos los realizado por Toopcham, Mes, Wichers, Roytrakul, & Yongsawatdigul (2017), donde investigaron la bioaccesibilidad de los péptidos con actividad inhibidores de la ECA de los hidrolizados enzimáticos de proteínas del musculo de tilapia (*Oreochromis niloticus*), encontrando que aunque la digestión GI *in vitro* disminuyó la potencia de la inhibición de la ECA del hidrolizado de proteínas, mejoró la permeabilidad de los péptidos a través de monocapas de células Caco-2. Samaranayaka, Kitts, & Li-Chan (2010), evaluaron la absorción en células Caco-2 de péptidos con actividad antioxidante e inhibidora de la ECA de hidrolizados de merluza del Pacífico (*Merluccius productus*) luego de una digestión GI *in vitro*. Los péptidos antioxidantes aumentaron su capacidad luego de la digestión, sin embargo, los péptidos inhibidores de la ECA no presentaron ningún cambio; además solo los péptidos antioxidantes pasaron a través de las células Caco-2.

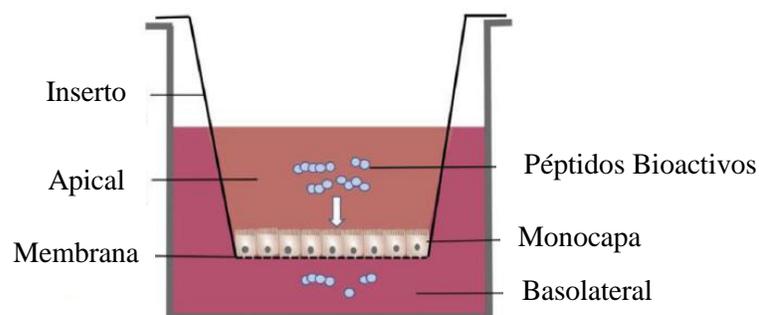


Figura 2.15. Transporte de péptidos bioactivos desde el lado apical de una monocapa de células Caco-2 cultivadas en la membrana del inserto, hasta el lado basolateral de “Bioavailability of bioactive peptides derived from food proteins across the intestinal epithelial membrane: A review” por Xu et al., 2019.

2.6. Proteínas funcionales de los hidrolizados de proteínas de subproductos acuícolas

Las propiedades funcionales están relacionadas con la interacción que ocurre entre las proteínas, o de estas con otras moléculas presentes en el alimento, como carbohidratos, lípidos, sales, volátiles y agua. Entre las cuales se encuentran la solubilidad de las proteínas,

la capacidad de absorción de agua y grasa, la capacidad de formación de espuma y su estabilidad, la capacidad emulsionante y la formación de geles, definidas en Tabla 2.11 (Ananey-Obiri et al., 2019; Bessada, Barreira, & Oliveira, 2019). Existe una aplicación potencial de los hidrolizados de proteínas y péptidos de subproductos de pescado como ingredientes funcionales en los sistemas alimentarios, como se muestra en la Tabla 2.12. Dichas propiedades funcionales corresponden a las características físicas y químicas que pueden modular la forma en que las proteínas se comportan en los sistemas alimentarios durante el procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo (Ananey-Obiri et al., 2019). Además de lo anterior, la funcionalidad de los hidrolizados de proteínas y péptidos se ve afectada también por factores intrínsecos, como tamaño molecular, estructura y conformación, composición y secuencia de aminoácidos, hidrofobicidad e hidrofilia, y por factores extrínsecos como pH, temperatura y grado de hidrólisis (Aryee, Agyei, & Udenigwe, 2018; Bessada et al., 2019; Kristinsson & Rasco, 2000a).

Tabla 2.11. Propiedades funcionales, mecanismos y su aplicación en alimentos

Funcionalidad	Descripción	Mecanismo principal	Aplicación
Solubilidad	Capacidad para disolverse en un solvente	Hidrofilia	Bebidas
Emulsionante	Adsorción de proteínas en la interfaz, recubrimiento de gotas de aceite	Adsorción interfacial, formación de película	Aderezos para ensaladas, sopas
Espumante	Adsorción de proteínas en la interfaz, revestimiento de celdas de aire	Adsorción interfacial, formación de película	Ingredientes batidos, pasteles, mousse, merengues
Retención de agua	Interacción de proteínas en agua, retención de agua e hinchazón.	Puentes de hidrógeno	Carne, salchichas, pasteles, pan de molde
Retención de grasa	Interacción de sabor, retención de sabor y grasa	Enlace hidrofóbico	Panadería, yogurt, productos de pescado
Gelificación	Formación de gel	Formación de red	Carne, salchichas, pastas, productos horneados

Tabla 2.12. Propiedades funcionales de los hidrolizados de proteínas de subproductos de pescado

Especie	Subproducto	Enzima	Propiedad Funcional*	Referencia
Pez gatillo (<i>Abalistes stellaris</i>)	Músculo	Tripsina	Solubilidad: > 72% IAE: ~ 25 m ² /g IEE: ~ 14 min CE: 187,78 ± 1,92% EE: 154,44 ± 1,92% a 30 min	Sripokar, Benjakul, & Klomklao (2019)
Jurel fino (<i>Decapterus macrosoma</i>)	Músculo	No definida	<u>Fracción < 3kDa:</u> Solubilidad: 3,15 ± 0,90% IAE: 44,63 ± 5,56 % IEE: 34,40 ± 1,86 %	Nasir & Sarbon (2019)
Esturión chino (<i>Acipenser sinensis</i>)	Músculo	Papaína	Solubilidad: 86,6- 98,7% IAE: 11,0 – 13,3 m ² /g IEE: > 94% WHC: 1,93 g H ₂ O/g proteína OHC: 2,59 g aceite/g proteína CE: 76,7%	Noman et al. (2018)
Atún barrilete (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	Víscera	Alcalasa	<u>GH de 20%:</u> Solubilidad: 91,9- 100% IAE: 37,95± 1,01 m ² /g IEE: 35,29 ± 1,02 min CE: 147,58% EE: 60% a 30 min	Klomklao & Benjakul (2018)
Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Esqueleto	Alcalasa	<u>GH de 23% (MW-FPH):</u> Solubilidad: > 90% IAE: ~ 7,5 m ² /g CE: ~ 40%	Nguyen, Jones, Kim, San Martin-Gonzalez, & Liceaga (2017)

* **IAE:** Índice de actividad emulsionante; **IEE:** Índice de estabilidad emulsionante; **WHC:** Capacidad de retención de agua; **OHC:** Capacidad de retención de aceite; **CE:** Capacidad espumante; **EE:** Estabilidad de la espuma.

2.6.1. Solubilidad de proteínas

La solubilidad es la propiedad que mide qué tanto se puede disolver el soluto (proteínas) en un solvente, en el caso de alimentos, dicho solvente es el agua, lo cual clasifica a la solubilidad de las proteínas como una propiedad hidrofílica. Esta generalmente se reporta como porcentaje de proteína soluble presente en el solvente en comparación con la proteína total de la muestra o del hidrolizado (Pelegri & Gasparetto, 2005). La solubilidad es probablemente una de las propiedades funcionales más importante de las proteínas hidrolizadas, debido a que afecta muchas de las otras propiedades funcionales, como por ejemplo la capacidad emulsificante, espumante y gelificante, convirtiéndola así un excelente indicador de la funcionalidad del hidrolizado y de sus potenciales aplicaciones (Ananey-Obiri et al., 2019; Kristinsson & Rasco, 2000a). La solubilidad de las proteínas es afectada tanto por interacciones hidrofóbicas, las cuales promueven la interacción proteína – proteína, generando una disminución de la solubilidad como por interacciones iónicas que promueven la interacción proteína - agua, conduciendo a una mayor solubilidad; debido a que los residuos iónicos presentes en la superficie de las proteínas inducen una repulsión electrostática entre sus moléculas y entre las capas de hidratación alrededor de los grupos iónicos (Aryee et al., 2018; Kristinsson & Rasco, 2000a).

En cuanto a los tres tipos principales de proteínas (estromales, miofibrilares y sarcoplásmicas) presentes en los músculos y tejidos del pescado según su solubilidad (Khan et al., 2020; Villamil et al., 2017), las proteínas miofibrilares en su estado nativo son las que presentan más baja solubilidad en agua a diferentes valores de pH. Sin embargo, cuando se presenta una ruptura de dichas proteínas, como por ejemplo con la hidrólisis enzimática; se produce estructuras más pequeñas como los péptidos, lo cual conduce a mejoras en la solubilidad (Ananey-Obiri et al., 2019; Kristinsson & Rasco, 2000a). Estas mejoras en la solubilidad de los hidrolizados van a depender tanto del grado de hidrólisis, como del pH. A mayores grados de hidrólisis, los hidrolizados van a poseer péptidos más pequeños, que tengan proporcionalmente más residuos polares, con la capacidad de formar enlaces de hidrógeno con el agua, y así aumentar la solubilidad. Si bien, existe una relación directamente proporcional entre la solubilidad y el grado de hidrólisis, se debe tener cuidado de no

hidrolizar demasiado la proteína, ya que esto puede tener efectos negativos sobre el resto de las propiedades funcionales (Karami & Akbari-Adergani, 2019). Por su parte, el pH afecta la solubilidad de dos maneras, una es por medio de la carga neta de los péptidos, ya que esta aumenta a medida que el pH se aleja de los puntos isoelectricos de la proteína, y la otra, por medio de la hidrofobicidad superficial, que promueve la agregación a través de interacciones hidrofóbicas (Halim, Yusof, & Sarbon, 2016)

2.6.2. Propiedades emulsionantes

Una emulsión se define como un sistema heterogéneo que consiste en al menos dos fases líquidas inmiscibles, una de las cuales se dispersa en la otra en forma de gotas. Estas pueden ser emulsiones agua en aceite (W/O) en las cuales se dispersa el agua en la fase oleosa, o emulsiones aceite en agua (O/W) en las cuales el aceite se dispersa en la fase acuosa, siendo estas las de mayor importancia en alimentos, debido a que están asociadas con productos como bebidas, helados, café, salsas, sopas, postres y aderezos (Jacobsen, 2016). Sin embargo, desde el punto de vista termodinámico, las emulsiones alimentarias son sistemas inestables que tienden a la separación, por medio de algunos mecanismos, que incluyen la coalescencia, la agregación, la sedimentación y la floculación de las gotas dispersas. Por este motivo es importante buscar la estabilidad física y química de las emulsiones, por medio de agentes emulsionantes, como las proteínas y sus hidrolizado, por sus características tensoactivas (Y. Li, Kong, Liu, Xia, & Chen, 2017). La propiedad emulsionante de las proteínas generalmente se determina por medio del índice de actividad emulsionante (IAE), el cual mide la cantidad de aceite que se puede emulsionar por unidad de proteína, y por medio del índice de estabilidad emulsionante (IEE), que mide la resistencia de la emulsión durante un tiempo específico (Aryee et al., 2018).

Las proteínas y sus hidrolizados son considerados buenos emulsionantes, más específicamente en las emulsiones O/W debido a que tienen la capacidad de absorberse rápidamente en la interfaz, lo cual implica la reorganización y exposición de los residuos de aminoácidos hidrofóbicos a la fase oleosa (apolar) y de los hidrofílicos a la fase acuosa (polar), generando una reducción de la tensión interfacial; además poseen la capacidad de interactuar con las moléculas vecinas, formando una película viscoelástica cohesiva que

puede soportar movimientos térmicos y mecánicos, evitando la coalescencia (Aryee et al., 2018; Karami & Akbari-Adergani, 2019; Kristinsson & Rasco, 2000a). Estas propiedades están directamente relacionadas con la estructura de la proteína, el peso molecular, la estabilidad conformacional, la composición de aminoácidos, la solubilidad en agua y la hidrofobicidad / hidrofilia de la superficie, además de factores como el grado de hidrólisis, la temperatura, el pH y la fuerza iónica (Bessada et al., 2019).

Las propiedades emulsionantes de la proteína hidrolizada se mejoran controlando cuidadosamente el grado de hidrólisis, ya que una hidrólisis extensa resulta en una pérdida drástica de dichas propiedades. Se sabe que al tener altos grados de hidrólisis, se obtienen péptidos más pequeños que aunque son altamente estables y se difunden rápidamente para adsorberse en la interfaz, no son lo suficientemente anfifílicos, por lo que son menos eficientes para reducir la tensión interfacial ya que no pueden desplegarse y ni reorientarse en la interfaz, como si lo hacen las proteínas con mayor peso molecular (Karami & Akbari-Adergani, 2019). Por su parte, el pH también afecta las propiedades emulsionantes de los hidrolizados al cambiar la hidrofobicidad de la superficie de la proteína. Cuando las proteínas están cerca al punto isoelectrico (PI), presentan baja capacidad emulsionante, dado que su carga neta es mínima, obstaculizando su migración a la interfaz. Por lo tanto, la actividad emulsionante de proteínas aumenta proporcionalmente si el pH del medio está alejado del PI (ya sea a los lados ácidos o alcalinos), no obstante, a un pH altamente alcalino, los polipéptidos se despliegan debido a cargas negativas, brindando una exposición más eficiente de residuos de aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos que promueven interacciones significativas en la interfaz aceite-agua (Halim et al., 2016).

2.6.3. Propiedades espumantes

Las espumas alimentarias consisten en burbujas de aire (fase gaseosa) dispersas en una fase líquida continua (laminar), y son de gran importancia en productos como cervezas, postres, panificados y algunos lácteos, teniendo un papel importante en su textura y estructura (Wouters, Rombouts, Fierens, Brijs, & Delcour, 2016). Sin embargo, este tipo de interfaces aire-agua son termodinámicamente inestables debido a que las interacciones entre las

moléculas de agua son mucho más favorables que las que existen entre las moléculas de agua y aire, haciendo que se presenten tres mecanismos principales de desestabilización, como son: drenaje, coalescencia y desproporción (engrosamiento). En la práctica, estos tres mecanismos pueden acelerarse entre sí, donde el drenaje, como su nombre lo indica, consiste en la pérdida de la película líquida entre burbujas de aire, ocasionado esto la coalescencia, donde se fusionan dichas burbujas adyacentes, y finalmente la desproporción, se da gracias a la desaparición de burbujas más pequeñas debido a gradientes de presión que causan la difusión del aire de burbujas más pequeñas a las más grandes (Gharbi & Labbafi, 2019). Por lo anterior, se hace necesarios agentes espumantes, como las proteínas y sus hidrolizados enzimáticos, que gracias a su naturaleza anfifílica, estabilizan cinéticamente las interfaces de la espuma; extendiendo su porción hidrofóbica al aire y su porción hidrofílica a la fase acuosa (Kristinsson & Rasco, 2000a).

La química de las propiedades espumantes de las proteínas y sus hidrolizados enzimáticos, tiene mucho en común con las propiedades emulsionantes, debido a que ambas propiedades se basan en las características superficiales de las proteínas (Kristinsson & Rasco, 2000a). Las proteínas presentan buenas propiedades espumantes, debido principalmente a que estas se difunden, adsorben y organizan en la interfaz, retardando los mecanismos de desestabilización de la espuma de las siguientes maneras: a) pueden estabilizar las burbujas de aire en las dispersiones formando una barrera estérica en la interfaz, evitando que las burbujas se acerquen entre sí y se fusionen (colapsen); b) disminuyen la tensión superficial tras la adsorción; c) a través de interacciones mutuas, las proteínas forman una película viscoelástica alrededor de las burbujas de aire, estabilizando la espuma. Donde, la cinética de adsorción y las propiedades mecánicas de las películas desarrolladas afectan fuertemente la formación de espuma y la estabilidad (Karami & Akbari-Adergani, 2019; Wouters et al., 2016). El potencial espumante de las proteínas generalmente se evalúa en función de la capacidad espumante (CE), es decir, la cantidad inicial de espuma formada después de agitar o batir, y la estabilidad de la espuma (EE), que es la cantidad de espuma que queda después de un cierto tiempo (Aryee et al., 2018; Bessada et al., 2019).

Generalmente, las propiedades moleculares requeridas para obtener una buena capacidad espumante pueden ser diferentes de las necesarias para lograr una adecuada estabilidad de la espuma. De hecho, la capacidad se rige principalmente por los coeficientes de difusión de las proteínas solubles hacia la interfaz aire-agua, los posibles cambios conformacionales y la reorganización de la interfaz; por su parte, la estabilización de la espuma va a depender principalmente de la formación de una película viscoelástica cohesiva que involucra cada burbuja de gas (Bessada et al., 2019). No obstante, estas propiedades al igual que las propiedades emulsionantes están directamente relacionadas con factores como el grado de hidrólisis y el pH. En muchos casos, un grado de hidrólisis bajo mejora profundamente la capacidad espumante, debido a que los péptidos producidos por la hidrólisis enzimática son mucho más flexibles que las proteínas nativas, lo cual mejora la difusión y la adsorción en la interfaz. Sin embargo, una hidrólisis excesiva puede reducir tanto la capacidad de formación de espuma como su estabilidad, debido a que los péptidos más pequeños no tienen la resistencia necesaria para formar una película viscoelástica suficientemente fuerte alrededor de las burbujas de aire, como si lo hacen los péptidos más grandes (Karami & Akbari-Adergani, 2019; Wouters et al., 2016).

La capacidad de formación de espuma se ve afectada por el pH del medio dispersante, debido a que la carga neta de las proteínas influye en la adsorción que estas pueden tener en la interfaz aire-agua, así, si el pH se encuentra cerca al punto isoeléctrico, su carga neta disminuye y por lo tanto su adsorción en la interfaz. En cuanto a la estabilidad de la espuma, la cual depende de la naturaleza de la película y del grado de interacción proteína-proteína dentro de la matriz, se espera que a pH muy ácidos o alcalinos esta disminuya debido a la repulsión que se puede generar entre los péptidos, debido a sus fuerzas iónicas (Halim et al., 2016; Karami & Akbari-Adergani, 2019). No obstante, los hidrolizados de proteínas de pescado tienen la propiedad inusual de tener buenas propiedades espumantes, y de formar espumas fuertes y estables en un amplio rango de pH (Halim et al., 2016; Kristinsson & Rasco, 2000a).

3. METODOLOGÍA

3.1. Manejo del sustrato

Las vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) fueron suministradas por las empresas Truchas Belmira (La Unión, Antioquia) y Piscícola de Occidente (San Félix, Antioquia). Estas fueron transportadas bajo refrigeración al laboratorio de Nutrición y tecnología de Alimentos de la Universidad de Antioquia. Debido a que la grasa presente en las vísceras puede ocasionar una rancidez oxidativa en los hidrolizados (Benjakul et al., 2014), se realizó un proceso de desengrasado por calentamiento, buscando además inactivar las enzimas endógenas (pepsina, tripsina, quimotripsina, colagenasa, elastasa) (Villamil et al., 2017). Para ello, se evaluaron tres diferentes procesos en cuanto a su eficiencia para remover la grasa presente:

- **Pretratamiento 1:** Calentamiento a 90°C, durante 20 minutos a las vísceras completas.
- **Pretratamiento 2:** Calentamiento a 60°C, durante 30 minutos a las vísceras completas.
- **Pretratamiento 3:** Calentamiento a 90°C, durante 20 minutos a las vísceras trituradas.

Posteriormente, se realizó un enfriamiento a -20°C por 24 horas, para separar la grasa sobrenadante en forma sólida de la fase acuosa (Figura 3.1). Finalmente, se realizó una homogenización de la fase acuosa en un procesador de alimentos Quick'n Easy (Black & Decker, Maryland, USA), y se almacenó el sustrato a -20°C hasta su posterior uso como sustrato de la reacción.



Figura 3.1. Proceso de extracción de grasa de las vísceras de trucha arcoíris.

3.2. Enzimas y reactivos

La proteasa utilizada para la hidrólisis enzimática fue la Alcalasa® 2.4L grado alimenticio (Novo Nordisk Co., Bagsværd, Dinamarca), una serina endopeptidasa producida a partir de la fermentación de *Bacillus licheniformis*, siendo su componente enzimático principal la Subtilisina Carlsberg (EC 3.4.21.62). Sus temperaturas de trabajo varían entre 30 y 65 °C y pH entre 7 y 9, dependiendo del tipo de sustrato (Novozymes, 2011). Las enzimas utilizadas para la digestión gastrointestinal *in vitro* fueron, pepsina (estándares 1:15000 5X NF) y pancreatina porcina (4X-100 unidades USP/mg), las cuales fueron obtenidas de MP Biomedicals (Solon, OH, USA). La enzima convertidora de angiotensina (ECA) utilizada para los ensayos IECA fue obtenida de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Los reactivos ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), 2,4,6-Tri (2-piridil) -s-triazina (TPTZ), diclorhidrato de 2,20-azo-bis- (2-metilpropionamida) (AAPH \geq 98%), Hidrato de N-Hipuril-Histidil-Leucina (HHL \geq 98%), Azul tripán, dipéptidos carnosina y anserina, caseína grado técnico y albúmina de suero bovino fueron comprados en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La fluoresceína sódica fue obtenida de Honeywell Fluka (Seelze, Alemania). Los reactivos usados para electroforesis, como: Acrilamida/Bisacrilamida (29:1), persulfato de amonio, tetrametilendiamina (TEMED), azul de bromofenol y azul brillante de Coomassie G-250 fueron obtenidos de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico. Los kits utilizados para determinar el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT), tiempo de protombina (PT) y la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) fueron obtenidos de Wiener Lab. (Rosario, Santa Fe, Argentina). Los reactivos metanol, acetonitrilo y ácido trifluoroacético grado HPLC, Folin-Ciocalteu y los medios de cultivo para microbiología fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania). Para los ensayos celulares, el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 15% de suero fetal bovino (SFB) fue obtenido de Laboratorios Microvet SRL (Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina) y los aminoácidos no esenciales, solución de antibióticos (penicilina/estreptomina), suero fetal bovino (SFB), buffer fosfato salino (PBS) y solución tripsina-EDTA (0,25% Trypsin

EDTA 1X) fueron obtenidos de Gibco® Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Los demás reactivos y solventes fueron de grado analítico estándar.

3.3. Métodos Analíticos

3.3.1. Análisis Proximal

Se estimó la composición proximal (proteína, lípidos, humedad y cenizas) de las vísceras frescas (V); las vísceras procesadas y desengrasadas (VT) y de los hidrolizados enzimáticos (HT).

3.3.1.1. Humedad y cenizas

El contenido de humedad se determinó gravimétricamente después de secar en estufa durante 24 h a 105 °C, hasta lograr un peso constante en las muestras, según la norma AOAC 930.15. El contenido de cenizas se determinó después de una calcinación de las muestras a 550 °C, de acuerdo con la norma AOAC 942.05.

3.3.1.2. Lípidos

El contenido total de lípidos en las muestras se determinó gravimétricamente después de una extracción con éter de petróleo y su respectiva evaporación, por el método de Soxhlet según la norma AOAC 960.39.

3.3.1.3. Proteína

El contenido total de proteína (N x 6,25) fue determinada usando el método de Kjeldahl según la norma AOAC 992.15. Adicionalmente, se utilizó el método de Micro-Kjeldahl seguido del método colorimétrico de Berthelot descrito por Nkonge and Ballance, (1982), para determinar el contenido de nitrógeno de las muestras sometidas a digestión gastrointestinal *in vitro*.

La concentración proteica de las fracciones de los hidrolizados se determinó mediante el método colorimétrico de Lowry and Randall, (1951). Para el análisis, se tomaron 200 µl de muestra y se mezclaron con 1 mL de la solución C (Na₂CO₃ 2% m/v - NaOH 0,1 N; CuSO₄.5H₂O 1% m/v y tartrato de Na y K 2% m/v), se agitaron vigorosamente y se dejaron reposar durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó 100 µl de solución de Folin (50% v/v en agua destilada) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 750 nm. Para el cálculo de la proteína, se realizó una curva de calibración con albúmina de suero bovino (0 – 0,4 mg/mL).

3.3.2. Cuantificación de metales pesados

La cuantificación de mercurio, plomo, cadmio y arsénico fue realizada por el grupo diagnóstico y control de la contaminación (GDCON) de la Universidad de Antioquia. Para esto, se adicionaron 3 mL de ácido nítrico y 1 mL de ácido clorhídrico a 0,5 g de vísceras de trucha arcoíris. La digestión acida se realizó en un equipo digestor por microonda SpeedWave (Berghof, Eningen, Alemania) usando un programa de calentamiento según el método 3051A numeral 11.3.5 (EPA, 2007) Posterior a la digestión, se hicieron lavados con agua desionizada y se aforó la solución a 10 mL, para finalmente realizar la lectura de los metales mediante en un equipo de emisión atómica MP-AES 4100 (Agilent, California, USA). El arsénico y el mercurio fueron leídos por la técnica de generación de hidruros con borohidruro de sodio en el mismo equipo MP-AES4100.

3.3.3. Análisis Microbiológicos

Para la determinación de la calidad microbiológica de las muestras, se realizaron los análisis de recuento de coliformes totales y *Escherichia coli*, la detección de *Salmonella sp.*, según lo dispuesto en la NTC-5443, (2015), el recuento de microorganismos mesófilos por la NTC-4519, (2009), recuento de Anaerobios Sulfito Reductores usando la NTC-5056, (2002), recuento de mohos y levaduras por la NTC-5698, (2009).

3.3.4. Determinación de composición de aminoácidos

El contenido de aminoácidos se determinó usando un analizador automático de aminoácidos Biochrom 30 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido), cuyo principio básico de operación es la cromatografía de intercambio catiónico según el método Moore et al., (1958), y posterior reacción con ninhidrina. Previo al análisis cromatográfico, las muestras fueron hidrolizadas en medio ácido para liberar todos los aminoácidos presentes. Para esto, 1 mg de proteína de las muestras fue hidrolizada con 1 mL ácido metansulfónico (MSA) 4 M - 0,2% de triptamina a 110 °C bajo atmósfera de vacío durante 24 h. Posteriormente, se tomaron 800 µL de muestra hidrolizada y se le adicionó 10 µL de L-norleucina (25 mM) y 190 µL de Buffer de carga (pH 2,2). Los aminoácidos liberados fueron separados mediante HPLC por una columna de intercambio catiónico (PEEK, resina Ultropac8), utilizando buffers de citrato de sodio (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido), con un gradiente de pH entre 2,2 a 4,25 a una temperatura de 37 °C. Una vez realizada la separación, los aminoácidos reaccionan con Ninhidrina (derivación post-columna) a una temperatura de 135 °C, y fueron detectados a dos longitudes de onda, 440 nm para prolina y 570 nm para el resto aminoácidos. La identificación y cuantificación de los aminoácidos se realizó mediante una curva de calibración utilizando una solución estándar de dieciocho aminoácidos puros (AAS-18, Sigma-Aldrich) y se usó L-norleucina como estándar interno para corregir el valor de la concentración de aminoácidos.

3.3.5. Determinación de dipéptidos de Histidina (Anserina y Carnosina)

Previo a las determinaciones de los dipéptidos, las muestras se trataron con ácido tricloroacético (TCA) con el fin de precipitar las proteínas de mayor peso molecular. Para esto, se homogeneizaron 20 mg de proteína de las muestras con 1 mL de TCA 0,6 M durante 5 min y posteriormente, se centrifugaron a 2.600 x g durante 15 min a 4 °C. Se tomó 200 µL de sobrenadante y se diluyó en 200 µL de KH₂PO₄ (90 mM - pH 5). Los niveles de los dipéptidos anserina y carnosina se determinaron usando el método descrito por Sri Kantha, Takeuchi, Watabe, & Ochi, (2000). Se inyectaron 20 µL de cada muestra a un HPLC equipado con un detector UV (Shimadzu, Kioto, Japón) y la separación cromatográfica se desarrolló utilizando una columna intercambio catiónico Zorbax® 300-SCX (4,6 x 250 mm, 5 µm) de

Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Se utilizó una fase móvil de KH_2PO_4 90 mM con 10% metanol, a una temperatura de 55 °C y un flujo de 1 mL/min. La detección de los dipéptidos se realizó a una longitud de onda de 210 nm. Para su cuantificación, se relacionó las áreas de los picos obtenidas en cada muestra con la concentración del dipéptido por interpolación en la curva de calibración correspondiente, las cuales se construyeron con las áreas de pico versus concentraciones estándar de carnosina y anserina (0 - 1 mg/mL).

3.3.6. Determinación de la actividad enzimática

3.1.1.1. Actividad de la Alcalasa® 2.4L

Se determinó la actividad proteolítica de la Alcalasa® 2.4 L usando caseína como sustrato, de acuerdo con el método de Anson (1938), Folin & Ciocalteu (1927) con ligeras modificaciones. Para esto, 600 µl de caseína (0,65 % m/v) se hidrolizaron con 120 µl de enzima (0,1 – 0,2 UA/mL) a una temperatura de 37 °C durante 10 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 600 µl de TCA (110 mM) e incubando a 37°C durante 30 min. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm durante 2 minutos, se tomaron 300 µl del sobrenadante y se mezclaron con 750 µl de Na_2CO_3 (0,5 M) y 150 µl de Reactivo de Folin - Ciocalteu, continuando con una incubación a 37°C durante 30 min. La absorbancia de la muestra se midió a 660 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Como patrón se empleó una curva estándar de solución de tirosina entre 0 - 200 mg/L. Los resultados se reportaron como Unidades Anson (UA)/ mL de enzima, donde una unidad se define como la cantidad de enzima necesaria para producir un color equivalente a 1,0 µmol de tirosina por minuto a pH 7,5 y 37 °C.

3.1.1.2. Actividad de la pepsina

La actividad proteolítica de la pepsina se determinó por el método de Anson (1938) con ligeras modificaciones, usando hemoglobina como sustrato. Se preparó una solución madre de pepsina (0,5 mg/mL) en NaCl 150 mM, la cual posteriormente se diluyó en HCl 10 mM a diferentes concentraciones de trabajo (entre 5 µg/mL a 30 µg/mL). Se hidrolizaron 500 µl

de hemoglobina (2 % m/v, pH 2) con 100 µl de la dilución de pepsina correspondiente, a 37 °C durante 10 min, transcurrido este tiempo se adicionó 1 mL de TCA (5% m/v) para detener la reacción. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 6.000 rpm durante 30 min con el fin de precipitar la hemoglobina no hidrolizada. Finalmente, se tomó el sobrenadante y se leyó la absorbancia a 280 nm. Los resultados se reportaron como Unidades Anson (UA)/ mg de enzima, donde una unidad produce un cambio de absorbancia (a 280nm) de 0,001 por minuto a pH 2,0 y 37 °C, medido como productos solubles en TCA.

3.1.1.3. Actividad de la pancreatina

La pancreatina es una mezcla de varias enzimas digestivas, como amilasa, tripsina, lipasa, ribonucleasa y quimotripsina, sin embargo, la cantidad de pancreatina añadida para la digestión gastrointestinal *in vitro* se basa en la actividad de la tripsina (Minekus et al., 2014). Se determinó la actividad de la enzima empleando éster metílico de p-tolueno-sulfonil-L-arginina (TAME) como sustrato, de acuerdo al método descrito por Hummel (1959). Se preparó diferentes concentraciones de pancreatina, las cuales oscilaban entre 0,1 mg/mL a 1 mg/mL en HCl 1 mM. Antes de iniciar la reacción, se mezcló 30 µl de TAME (10 mM) con 260 µl de buffer Tris/HCl 46 mM (pH 8,1), y se incubó a 25°C durante 4 min. Posteriormente, se adicionó 10 µl de solución de pancreatina para cada concentración y se registró el aumento de la absorbancia a 247 nm durante 10 min en continuo hasta nivelación. Los resultados se reportaron como Unidad/mg de enzima, donde una unidad hidroliza 1 µmol TAME por minuto a 25 °C, pH 8,1.

3.3.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis SDS-PAGE se realizó según el método descrito por Laemmli (1970), utilizando un gel compactador del 4% y un gel de separación del 15%. Las muestras se diluyeron en buffer de carga (Tris 0,0625 M, SDS 2% m/v, glicerol 10% v/v) asegurando una concentración final de proteína de 3 mg/mL, de cada muestra se cargó 10 µl en cada pozo. Para las muestras que se analizaron en condiciones reducidas, se les adicionó β - mercaptoetanol (5% v/v) e incubó a 100 °C durante 3 min. Para estimar el peso molecular de las muestras, se utilizó un marcador de amplio espectro con un rango de peso molecular de 2

a 250 kDa (Precisión Plus Protein, Bio-Rad, California, USA). La electroforesis se realizó a corriente constante (30 mA por gel, voltaje máximo 200 V) a temperatura ambiente en un equipo Mini-Protean II (Bio-Rad, California, USA). Posteriormente, se realizó una coloración con Coomassie Brilliant Blue durante 2h, seguido de decoloraciones sucesivas (etanol 30%, ácido acético 10%).

3.3.8. Cromatografía de exclusión molecular (filtración en gel)

La distribución de pesos moleculares de las vísceras de trucha arcoíris y sus hidrolizados se realizó en un sistema FPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare, Illinois, USA), utilizando dos columnas analíticas de exclusión molecular con un volumen total (V_T) de 24 mL, compuestas por una matriz de dextrano unido covalentemente con agarosa altamente sustituida. La columna Superdex 75 10/300 GL (límite de exclusión 100 kDa, rango de separación 3 -70 kDa, GE Healthcare), se calibró con azul de dextrano (volumen de exclusión: $V_0 = 7,3$ mL), albúmina (67 kDa), ovoalbúmina (44 kDa), quimotripsina (25 kDa), ribonucleasa (19 kDa) y aprotinina (6,5 kDa) obteniéndose así una curva de calibración y por tanto una expresión para la determinación de los pesos moleculares (MW). La segunda columna utilizada fue una GLP Superdex Peptide 10/300 (límite de exclusión 10 kDa, rango de separación 100 Da-7000 Da, GE Healthcare), con la cual, se realizó una curva de calibración con azul de dextrano (volumen de exclusión, $V_0 = 7,6$ mL), aprotinina (6500 Da), vitamina B₁₂ (1855 Da) y ácido hipúrico (179,14 Da), con el fin de determinar los pesos moleculares de los péptidos presentes en las muestras. En ambas columnas se inyectaron 500 μ L de muestras solubles en buffer PBS (pH 7,4). Para la elución se utilizó buffer PBS (pH 7,4) con un flujo de 0,4 mL/min a 25 °C. Los polipéptidos y péptidos se detectaron por absorbancia a 210 nm.

3.4. Proceso de Hidrólisis Enzimática

3.4.1. Efecto del pH y la temperatura en la actividad proteolítica de la Alcalasa® 2.4L

Se evaluó el efecto del pH y la temperatura (T) sobre la actividad proteolítica (AP) de la Alcalasa® 2.4L, aplicando un diseño factorial central compuesto (CCFD). En la Tabla 3.1 se

muestra las variables independientes (pH y T) con tres niveles (-1, 0 y +1), los cuales fueron seleccionados de acuerdo con las especificaciones técnicas de la enzima, y tomando AP como variable respuesta.

Tabla 3.1. Variables independientes, sus niveles codificados y reales utilizados en RSM para la optimización la actividad proteolítica de la Alcalasa® 2.4L

Variable Independiente	Niveles		
	-1	0	1
pH	7,5	8,5	9,5
Temperatura: T (°C)	40	50	60

La Tabla 3.2 presenta las 11 corridas experimentales aleatorizadas según el diseño experimental, en las cuales, se determinó la actividad proteolítica de la Alcalasa® 2.4L usando VT como sustrato de acuerdo con el método descrito en el numeral 3.3.6.1. El análisis de los datos del diseño se realizó con el software Design Expert® 7.0.0 (Stat-Ease, Inc., Minnesota, USA), donde el ajuste del modelo, la significancia estadística de los coeficientes de regresión y la interacción entre las diferentes variables independientes fueron probados mediante un ANOVA.

Tabla 3.2. Matriz de diseño central compuesto, para evaluar el efecto del pH y temperatura sobre la actividad proteolítica de la Alcalasa® 2.4L

Experimento	pH	T (°C)
1	9,5	50
2	8,5	40
3	8,5	50
4	7,5	50
5	8,5	60
6	7,5	60
7	9,5	60
8	8,5	50
9	7,5	40
10	9,5	40
11	8,5	50

La significancia de los coeficientes estimados en el modelo se probó con el estadístico F (valor-p) y un nivel de confianza del 95%. Se empleó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para optimizar la actividad proteolítica de Alcalasa® 2.4L en función del pH y la temperatura en la hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris. Finalmente se verificó el ajuste del modelo polinomial, comparando los resultados predichos con resultados experimentales realizados por triplicado.

3.4.2. Proceso de hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris

El proceso de hidrólisis se realizó en dos reactores diferentes. En el primero, un reactor de vidrio de 0,5L, se evaluó la cinética enzimática y el efecto de la concentración de sustrato (S), la concentración de enzima (e) y la temperatura (T) sobre el grado de hidrólisis (GH) en la hidrólisis enzimática. En dicho reactor el control del pH y la temperatura se realizó por medio de un electrodo combinado de vidrio, conectado a un titulador automático Titrando 842 operado con el software Tiamo 1.2.1 (Metrohm, Herisau, Suiza). Una vez obtenidas las mejores condiciones de S , e y T para la hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L en el reactor de 0,5 L (modelo), se escaló la reacción a un reactor BioFlo 110 de 7,5 L (New Brunswick Scientific, Nueva Jersey, USA), con el objetivo de evaluar el efecto de la concentración de grasa (G) de las vísceras de trucha arcoíris y la velocidad de agitación de la reacción (v) en el grado de hidrólisis. En dicho reactor (prototipo) el pH y la temperatura fueron controlados por medio del software BioCommand (New Brunswick Scientific, Nueva Jersey, USA). Para el escalado, se empleó la ecuación 3.1:

$$\left(\frac{N \cdot D^2 \cdot \rho}{\mu}\right)_M = \left(\frac{N \cdot D^2 \cdot \rho}{\mu}\right)_P \quad (3.1)$$

Donde N (s^{-1}) es la velocidad del impulsor, D (m) es el diámetro del impulsor, ρ (kg/m^3) la densidad del fluido y μ ($kg/m.s$) la viscosidad del fluido. Sin embargo, debido a que el sustrato en el modelo es el mismo que en el prototipo, la ecuación 3.1, se simplificó y transformó en la ecuación 3.2.

$$(N \cdot D^2)_M = (N \cdot D^2)_P \quad (3.2)$$

Sabiendo que $N_M = 8 \text{ s}^{-1}$ (480 rpm), $D_M = 0,05 \text{ m}$ y $D_P = 0,077 \text{ m}$, se obtiene un N_P de $3,37 \text{ s}^{-1}$ (202 rpm). No obstante, debido a estudios previos realizados en el grupo de Investigación Nutrición y tecnología de Alimentos de la Universidad de Antioquia por Zapata, Moya, & Figueroa (2019), se establece que los niveles para la velocidad de agitación (v) en el prototipo deben estar entre 75 a 125 rpm.

En ambos niveles, la reacción fue monitoreada por medio de la determinación del GH, utilizando el método de pH-stat. La reacción se detuvo por calentamiento a $85 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min, asegurando la inactivación de la enzima. Posteriormente, los hidrolizados se enfriaron en baño de hielo y se centrifugaron a 6.700 g a $10 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 min, con el objetivo de recolectar la fracción rica en proteínas hidrolizadas. La producción de hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris (HT) se muestra en la Figura 3.2.

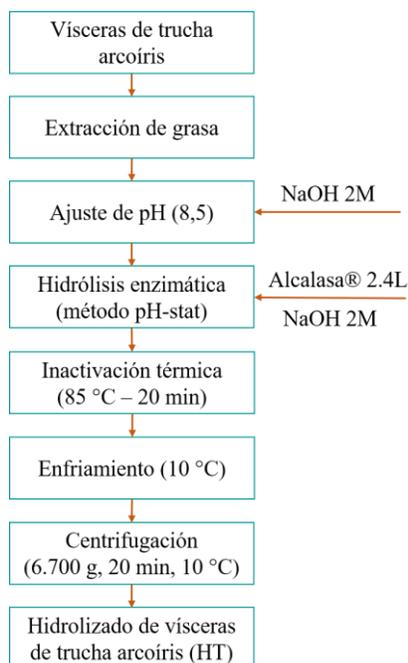


Figura 3.2. Producción de hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Una vez obtenidos los hidrolizados, estos fueron caracterizados mediante análisis de composición proximal, análisis microbiológicos, composición total de aminoácidos, perfil de peso molecular por cromatografía de exclusión molecular, de acuerdo con las metodologías descritas en el numeral 3.3; y empleados para la determinación de propiedades biológicas y funcionales.

3.4.3. Determinación del Grado de hidrólisis (GH)

El GH fue determinado por medio del método del pH-stat, el cual consiste en mantener constante el pH de la reacción por adición de base, para neutralizar los protones liberados en la ruptura de cada enlace peptídico, como se describe en el capítulo 2, numeral 2.3.2. Lo cual se define por medio de las ecuaciones 3.3 a 3.5, obtenidas por Adler-Nissen (1986):

$$\text{GH (\%)} = \frac{V_B \cdot M_B}{M_P \cdot \alpha \cdot h_{tot}} \cdot 100 \quad (3.3)$$

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1+10^{pH-pK}} \quad (3.4)$$

$$pK = 7,8 + \frac{(298 - T)}{298 \cdot T} \cdot 2400 \quad (3.5)$$

Donde V_B (mL) es el volumen consumido de base durante la reacción, M_B (mol/L) es la molaridad de la base (NaOH 2M), M_P (g) es la masa de la proteína, h_{tot} (mmol/g proteína) es el número total de enlaces peptídicos en la muestra, α es el grado de disociación promedio de los grupos α -NH liberados en la hidrólisis, el cual depende del pH y el pK, que a su vez es función de la temperatura, como se aprecia en la ecuación 3.5.

3.4.4. Determinación del número total de enlaces peptídicos (h_{tot})

El número total de enlaces peptídicos (h_{tot}) de las vísceras de trucha arcoíris en mmol/g, se determinó a partir de su composición de aminoácidos (numeral 3.3.4), como el inverso del

promedio de pesos moleculares de los aminoácidos presentes en las proteínas de vísceras de trucha arcoíris ($\overline{PM_{aa}}$) en g/mol, según la siguiente ecuación (Adler-Nissen, 1986):

$$h_{tot} = \frac{1}{\overline{PM_{aa}}} \times 1000 \quad (3.6)$$

3.4.5. Efecto de la concentración de sustrato, concentración de enzima y temperatura sobre la hidrólisis enzimática de las vísceras de trucha arcoíris

Se aplicó un diseño experimental factorial central compuesto, con dos puntos axiales ($\alpha = 1,682$), para evaluar el efecto de los factores concentración de sustrato (S), concentración de enzima (e) y temperatura (T), sobre el grado de hidrólisis (GH). En la Tabla 3.3 se muestra los niveles de los factores, los cuales fueron definidos con base en ensayos previos, y tomando GH como variable respuesta.

Tabla 3.3. Variables independientes (S , e y T), sus niveles codificados y reales utilizados en RSM para la optimización del GH

Variable independiente	Niveles		
	-1	0	1
Concentración de sustrato: S (% m/v)	2,00	4,00	6,00
Concentración de enzima: e (UA/g)	0,24	0,48	0,72
Temperatura: T (°C)	45	55	65

En la Tabla 3.4 se presentan las 20 corridas experimentales en forma aleatoria, según el diseño experimental, en las cuales, se determinó el GH de la hidrólisis enzimática de acuerdo con el método descrito en el numeral 3.4.3. El análisis de los datos del diseño se realizó con el software Design Expert® 7.0.0 (Stat-Ease, Inc., Minnesota, USA), donde el ajuste del modelo, la significancia estadística de los coeficientes de regresión y la interacción entre las diferentes variables independientes fueron probados mediante un ANOVA. La significancia de los coeficientes estimados en el modelo se probó con el estadístico F (valor- p) y un nivel de confianza del 95%. Para optimizar las condiciones de la hidrólisis enzimática se empleó la metodología de superficie de respuesta (RSM), por medio de la cual se definieron las

condiciones de los factores para maximizar el GH. Finalmente se verifico el ajuste del modelo polinomial, comparando los resultados predichos con resultados experimentales realizados por triplicado.

Tabla 3.4. Matriz de diseño central compuesto, para evaluar el efecto de S, e y T sobre el GH de la hidrólisis enzimática

Experimento	S (% m/v)	e (UA/g)	T (°C)
1	6,00	0,24	45
2	4,00	0,48	55
3	4,00	0,88	55
4	7,36	0,48	55
5	2,00	0,72	45
6	2,00	0,72	65
7	0,64	0,48	55
8	4,00	0,48	55
9	4,00	0,48	55
10	6,00	0,24	65
11	4,00	0,48	55
12	4,00	0,48	55
13	4,00	0,48	55
14	4,00	0,48	71,8
15	6,00	0,72	65
16	4,00	0,48	38,2
17	2,00	0,24	45
18	4,00	0,07	55
19	6,00	0,72	45
20	2,00	0,24	65

3.4.6. Efecto de la concentración de grasa y la velocidad de agitación sobre la hidrólisis enzimática de las vísceras de trucha arcoíris

Se evaluó el efecto de la concentración de grasa (G) presente en las vísceras y la velocidad de agitación (v) sobre el GH, aplicando un diseño factorial central compuesto (CCFD). En la Tabla 3.5 se muestra las variables independientes (G y v) con tres niveles (-1, 0 y +1), los cuales fueron seleccionados de acuerdo con ensayos previos, y tomando GH como variable respuesta.

Tabla 3.5. Variables independientes (G y v), sus niveles codificados y reales utilizados en RSM para la optimización del GH

Variable independiente	Niveles		
	-1	0	1
Concentración de grasa: G (% m/m)	5,09	15,28	25,46
Velocidad de agitación: v (rpm)	75	100	125

Tabla 3.6. Matriz de diseño central compuesto, para evaluar el efecto de G y v sobre el GH de la hidrólisis enzimática

Corrida	G (% m/m)	v (rpm)
1	25,460	125,00
2	15,280	100,00
3	5,089	125,00
4	15,280	135,36
5	15,280	100,00
6	5,089	75,00
7	15,280	100,00
8	15,280	64,64
9	25,460	75,00
10	25,460	100,00
11	15,280	100,00
12	15,280	100,00
13	5,089	100,00

La Tabla 3.6 presenta las 13 corridas experimentales aleatorizadas según el diseño experimental, en las cuales, se determinó el GH. El análisis de los datos del diseño se realizó con el software Design Expert® 7.0.0 (Stat-Ease, Inc., Minnesota, USA), donde el ajuste del modelo, la significancia estadística de los coeficientes de regresión y la interacción entre las diferentes variables independientes fueron probados mediante un ANOVA. La significancia de los coeficientes estimados en el modelo se probó con el estadístico F (valor-p) y un nivel de confianza del 95%. Se empleó la metodología de superficie de respuesta (RSM) para maximizar el GH. Finalmente se verificó el ajuste del modelo polinomial, comparando los resultados predichos con resultados experimentales realizados por triplicado.

3.5. Modelado de la cinética de hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

La hidrólisis enzimática de proteínas se ha representado matemáticamente a través de la una ecuación exponencial (ecuación 3.7) propuesta por Márquez & Vázquez (1999). La cual ha sido ampliamente usada para modelar la cinética enzimática de proteínas de lactosuero (Martínez-Araiza et al., 2011; Valencia et al., 2019), plasma bovino (Figuroa, Zapata, & Gutiérrez, 2012), vísceras de tilapia roja (Zapata et al., 2018) y músculo de salmón (Valencia et al., 2019), debido a que es considerado un modelo de alta precisión, simplicidad y capacidad de predicción.

$$\frac{d(\text{GH})}{dt} = a \cdot e^{-b \cdot \text{GH}} \quad (3.7)$$

Si se integra dicha ecuación entre los límites de las condiciones de reacción inicial y final, se obtiene que:

$$\text{GH} = \frac{1}{b} \ln (abt + 1) \quad (3.8)$$

Donde los parámetros a y b están conformados por un grupo de constantes cinéticas que dependen de los mecanismos cinéticos de la reacción supuestos para el modelo, como se

muestra en la Tabla 3.7, publicada por primera vez por Qi & He (2006). Por lo anterior, se empleó la ecuación 3.8 para modelar el comportamiento cinético de la reacción de hidrólisis enzimática de proteínas de víscera de trucha arcoíris (sustrato) con Alcalasa® 2.4L, con la cual se evaluó cuatro mecanismos diferentes: sin inhibición (Michaelis-Menten), inhibición por sustrato, inhibición por producto e inhibición por sustrato y producto. Para esto, se empleó en un reactor batch de 0,5L controlando parámetros del proceso como: pH (8,5), temperatura (60 °C) y tiempo de reacción (6 h). Para el desarrollo de los modelos, las concentraciones de sustrato y enzima se trabajaron en mM, con el objetivo de determinar las constantes cinéticas en unidades comparables con otras investigaciones, además se realizaron las siguientes suposiciones:

1. Temperatura y volumen constante.
2. El reactor batch es perfectamente mezclado.
3. La densidad y la capacidad calorífica de la mezcla permanece constante.
4. La reacción es no elemental, con sucesión de reacciones elementales de primer orden aparente.
5. La velocidad de reacción no elemental obedece la ley de Michaelis-Menten.

Tabla 3.7. Expresiones para los parámetros a y b en función de los mecanismos de reacción, de Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model por Qi & He, 2006.

Mecanismo	a	b
Sin Inhibición	$\frac{k_2 e_0}{S_0}$	$\frac{k_3 K_m}{k_2}$
Inhibición por sustrato	$\frac{k_2 K_S e_0}{K_S S_0 + S_0^2}$	$\frac{k_3 K_m K_S}{k_2 (K_S + S_0)}$
Inhibición por producto	$\frac{k_2 K_P e_0}{K_P S_0 + K_m P}$	$\frac{k_3 K_m K_P S_0}{k_2 (K_P S_0 + K_m P)}$
Inhibición por sustrato y producto	$\frac{k_2 K_S K_P e_0}{K_S K_P S_0 + K_P S_0^2 + K_m K_P P}$	$\frac{k_3 K_m K_S K_P S_0}{k_2 (K_S K_P S_0 + K_P S_0^2 + K_m K_P P)}$

3.5.1. Determinación de parámetros cinéticos

Para el modelado de la hidrólisis enzimática de las vísceras de trucha arcoíris, se comenzó con la determinación de los parámetros cinéticos (V_{max} , K_m , k_2 , k_d , K_S y K_P) de manera experimental, en función del tipo de inhibición evaluada.

3.5.1.1. Constantes cinéticas de Michaelis-Menten

Los parámetros cinéticos velocidad máxima (V_{max}) y constante de Michaelis-Menten (K_m) se determinaron ajustando la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación 3.9) a la gráfica de velocidad inicial (v_0) en función de la concentración inicial de sustrato (S_0), llamada curva de saturación (Copeland, 2000), por medio de una regresión no lineal usando el software MATLAB R2015a (MathWorks Inc., Natick, MA, USA). Los experimentos se realizaron a diferentes concentraciones de sustrato inicial, las cuales variaron desde 0,25 a 11% (m/m) (21.5 - 946 mM).

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot S_0}{S_0 + K_m} \quad (3.9)$$

La velocidad inicial de la hidrólisis se calculó a partir de la pendiente del gráfico de concentración de producto, que corresponde en este caso al hidrolizado (P), que representa los grupos α -amino liberados (α -NH) con respecto al tiempo, P (mM) se determinó de acuerdo con la ecuación 3.10:

$$P = \frac{V_B \cdot M_B}{\alpha} \quad (3.10)$$

Donde V_B (mL) es el volumen consumido de base durante la reacción, M_B (mol/L) es la molaridad de la base (NaOH 2M) y α es el grado de disociación promedio de los grupos α -NH liberados en la hidrólisis, determinado con la ecuación 3.4.

3.5.1.2. Inhibición por sustrato

Cuando se presenta una inhibición por sustrato, una segunda molécula de sustrato se une al complejo ES para formar un complejo ternario inactivo (SES), presentándose una inhibición de tipo acompetitiva (Copeland, 2000). Para calcular los parámetros V_{max} , K_m y la constante de inhibición por sustrato (K_S), se ajustó la ecuación 3.11 descrita por Copeland, (2000) a la curva de saturación (v_0 vs S_0) por medio de una regresión no lineal usando el software MATLAB R2015a (MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

$$v_0 = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{S_0} + \frac{S_0}{K_S}} \quad (3.11)$$

3.5.1.3. Inhibición por producto

Se evaluó la inhibición que pueden ejercer los productos de la hidrólisis (P) sobre la reacción enzimática de vísceras de trucha arcoíris, empleando la metodología descrita por Valencia, Pinto, & Almonacid (2014) con algunas modificaciones. Se prepararon hidrolizados a las condiciones óptimas ($S_0 = 433$ mM, $e_0 = 0,62$ mM, $T = 60$ °C y $pH = 8,5$) con un GH de 20%. Posteriormente, se determinaron las velocidades iniciales (v_0) de hidrólisis a diferentes concentraciones de sustrato inicial (S_0) como se describió en el numeral 3.5.1.1, pero en este caso en presencia del producto de la hidrólisis (inhibidor) a dos concentraciones diferentes (5% y 10% m/m). Para determinar el tipo de inhibición por productos y sus constantes (K_P), se ajustaron globalmente las gráficas de velocidad inicial vs S_0 a las ecuaciones de inhibición competitiva, no competitiva y acompetitiva, ecuaciones 3.12, 3.13 y 3.14 descritas por Copeland, (2000), respectivamente, utilizando toolbox “curve fitting” del software MATLAB R2015a (MathWorks Inc., Natick, MA, USA).

$$v_0 = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{S_0} + \frac{K_m P}{S_0 K_P}} \quad (3.12)$$

$$v_0 = \frac{V_{max}}{1 + \frac{P}{\alpha K_P} + \frac{K_m}{S_0} + \frac{K_m P}{S_0 K_P}} \quad (3.13)$$

$$v_0 = \frac{V_{max}}{1 + \frac{P}{\alpha K_P} + \frac{K_m}{S_0}} \quad (3.14)$$

3.5.1.4. Constantes cinéticas de inactivación térmica de la enzima

Las curvas obtenidas para GH en función del tiempo a diferentes concentraciones iniciales de sustrato (S_0) y de enzima (e_0), se ajustaron al modelo general establecido en la ecuación 3.8, utilizando toolbox “curve fitting” del software MATLAB R2015a (MathWorks Inc., Natick, MA, USA), donde se determinó los parámetros a y b . Una vez determinados dichos parámetros, la constante cinética de inactivación térmica (k_d) se halló a partir de la pendiente obtenida al graficar a/b vs e_0/S_0 (ecuación 3.15).

$$\frac{a}{b} = \frac{k_2^2}{k_d} \cdot \frac{e_0}{S_0} \quad (3.15)$$

Donde k_2 es de la constante de velocidad catalítica, la cual se determinó por medio de la ecuación 2.5 (capítulo 2). Es importante resaltar que cualquiera que sea el mecanismo, la razón a/b da como resultado siempre la misma expresión, como se muestra en la ecuación 3.15 (Valencia et al., 2019).

3.5.2. Modelos cinéticos

Si la hidrólisis enzimática se puede describir como una reacción no elemental 3.16, entonces la velocidad de reacción (v) estará determinada por la etapa irreversible, y por lo tanto ser proporcional a la concentración del complejo ES (ecuación 3.17) (Copeland, 2000):



$$v = S_0 \frac{d(GH)}{dt} = k_2 [ES] \quad (3.17)$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (3.18)$$

Donde k_1 y k_{-1} son constantes de velocidad de reacción y k_2 la constante cinética de la reacción de formación del producto (constante de velocidad catalítica), las cuales definen la constante de Michaelis-Menten (K_m). Si el mecanismo de inactivación de la enzima durante la reacción se expresa como (Márquez & Vázquez, 1999):



Donde k_3 es la constante de velocidad de reacción para inactivación, E_a y E_i son la enzima en su forma activa e inactiva, respectivamente. Por lo tanto, la ecuación cinética de la concentración de la enzima total (e) se puede expresar como:

$$- \frac{d(e)}{dt} = k_3 [E][ES] \quad (3.20)$$

Dividiendo la ecuación 3.17 por la ecuación 3.20, se obtiene la siguiente relación:

$$- S_0 \frac{d(GH)}{de} = \frac{k_2}{k_3 [E]} \quad (3.21)$$

Teniendo en cuenta las inhibiciones por sustrato y producto, la reacción de hidrólisis enzimática se puede expresar como (Qi & He, 2006):



Donde la relación entre las constantes de velocidad de reacción k_{-4} y k_4 define la constante de disociación para el complejo SES (K_S) y la relación entre k_{-5} y k_5 define la constante de disociación para el complejo EP (K_P). Utilizando la hipótesis de estado estacionario, donde se asume que la velocidad de formación de los complejos (ES, SES, EP) y la enzima es igual a su velocidad de desaparición (Qi & He, 2006), se tiene a partir de balances de masa que:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \quad (3.24)$$

$$[SES] = \frac{k_4[S][ES]}{k_{-4}} = \frac{[S][ES]}{K_S} = \frac{[S]^2[E]}{K_m K_S} \quad (3.25)$$

$$[EP] = \frac{k_5[E][P]}{k_{-5}} = \frac{[E][P]}{K_P} \quad (3.26)$$

Dado que toda la enzima presente en la reacción se encuentra de forma libre o compleja, la concentración total de la enzima en un momento dado sería:

$$e = [E] + [ES] + [SES] + [EP] \quad (3.27)$$

Reemplazando las ecuaciones 3.24 a 3.26 en la ecuación 3.27, y suponiendo que S es aproximadamente igual a S_0 , P a p y $K_m \ll S_0$, se obtiene una expresión para la concentración de enzima (E) en función de la concentración de enzima total y las constantes cinéticas:

$$[E] = \frac{e K_m K_S K_P}{K_S K_P S_0 + K_P S_0^2 + K_m K_S p} \quad (3.28)$$

Sustituyendo la ecuación 3.28 en la ecuación 3.21, se tiene que:

$$-\frac{d(GH)}{de} = \frac{k_2 (K_S K_P S_0 + K_P S_0^2 + K_m K_S p)}{k_3 K_m K_S K_P S_0} \frac{1}{e} \quad (3.29)$$

Integrando la ecuación 3.29 entre los límites de las condiciones de reacción inicial y final, se obtiene que:

$$e = e_0 \exp \left[\frac{k_3 K_m K_S K_P S_0 GH}{k_2 (K_S K_P S_0 + K_P S_0^2 + K_m K_S P)} \right] \quad (3.30)$$

Reemplazando la ecuación 3.24 y 3.28 en la ecuación 3.17:

$$\frac{d(GH)}{dt} = \frac{k_2 K_S K_P e}{K_S K_P S_0 + K_P S_0^2 + K_m K_S P} \quad (3.31)$$

Sustituyendo la ecuación 3.30 en la ecuación 3.31, se tiene que:

$$\frac{d(GH)}{dt} = \frac{k_2 K_S K_P e_0}{K_S K_P S_0 + K_P S_0^2 + K_m K_S P} \exp \left[\frac{k_3 K_m K_S K_P S_0}{k_2 (K_S K_P S_0 + K_P S_0^2 + K_m K_S P)} GH \right] \quad (3.32)$$

Siendo entonces los parámetros a y b para el mecanismo de inhibición por sustrato y producto:

$$a = \frac{k_2 K_S K_P e_0}{K_S K_P S_0 + K_P S_0^2 + K_m K_S P} \quad (3.33)$$

$$b = \frac{k_3 K_m K_S K_P S_0}{k_2 (K_S K_P S_0 + K_P S_0^2 + K_m K_S P)} \quad (3.34)$$

Al reemplazar las ecuaciones 3.33 y 3.34 en la ecuación 3.32, se obtiene la ecuación 3.7, la cual describe el grado de hidrólisis (GH) en función de dos parámetros, a y b . Si se integra dicha ecuación entre los límites de las condiciones de reacción inicial y final, se obtiene que la ecuación 3.8.

Para estudiar la cinética enzimática de la hidrólisis de vísceras de trucha arcoíris, se reemplazó las constantes cinéticas encontradas según la metodología descrita en el numeral 3.5.1 en las expresiones de los parámetros a y b establecidas para cada uno de los mecanismos

en la Tabla 3.7, y se evaluó a diferentes condiciones de concentración de sustrato inicial (S_0). Para cada uno de los mecanismos se evaluó la bondad de ajuste del modelo a través de los coeficientes de determinación (R^2 y R^2 ajustado), el error medio cuadrático (RMSE) y la suma de errores cuadrados (SSE).

3.6. Evaluación de Propiedades Bioactivas

Se evaluó de manera *in vitro* las propiedades antioxidantes, inhibidoras de la enzima convertidora de angiotensina y anticoagulantes de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L (HT) obtenidos a las condiciones óptimas a diferentes tiempos de reacción, asegurando así, la evaluación de las propiedades bioactivas a diferentes GH. Adicionalmente, se evaluó las propiedades antioxidantes e inhibidoras de la enzima convertidora de angiotensina de las fracciones obtenidas del proceso de ultrafiltración de HT y de los digeridos gastrointestinales simulados de VT y HT.

3.6.1. Actividad antioxidante

Se determinó la capacidad antioxidante de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L (HT), así como también de las fracciones obtenidas por proceso de ultrafiltración y de los digeridos gastrointestinales simulados, por medio de métodos *in vitro*. Se empleó los métodos de ORAC y HORAC, basados en reacciones de transferencia de átomos de hidrogeno (HAT), y los métodos ABTS y FRAP, basados en reacciones de transferencia de electrones (SET).

3.6.1.1. Método ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno)

Con este método es posible medir la capacidad de captación de radicales libres, al exponer la muestra a un generador de radicales peroxilo (ROO^{\bullet}), en este caso 2,2'-Azo bis-(2-metilpropionamida) dihidrocloruro (AAPH) a 37 °C, utilizando la fluoresceína (3',6'-dihidroxispirol[isobenzofuran-1(3H),9'9H-xanten]-3-ona) como sonda oxidable. Así, aquellas muestras con capacidad para secuestrar radicales peroxilo protegerán a dicha

molécula de la degradación oxidativa, inhibiendo o disminuyendo la pérdida de fluorescencia (Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001). Se empleó el método descrito por Ou, Hampsch-Woodill, & Prior (2001), con algunas modificaciones (Orsini Delgado, Galleano, Añón, & Tironi, 2015). Para esto, se mezclaron 25 μL de muestra o buffer PBS (control negativo) con 150 μL de solución de fluoresceína (53,3 nM) y se incubaron a 37°C durante 15 min. A continuación, se añadieron 25 μL de solución de AAPH (160 mM) para comenzar la reacción. La intensidad de fluorescencia (λ_{exc} : 485 nm; λ_{em} : 535 nm) se monitoreo cada minuto durante 45 min mediante un lector de microplacas Synergy HT - Siafrt (BioTek Instruments, Vermont, USA). En todos los casos, se calcularon las diferencias de áreas bajo la curva de descenso de fluorescencia entre el blanco (sin AAPH) y cada muestra. Se preparó una curva estándar usando diferentes concentraciones de Trolox (6,25 a 75 μM), expresando los resultados en μmoles equivalente de Trolox (ET)/g de proteína y en concentración de proteína que neutraliza el 50% de los radicales (IC_{50}).

3.6.1.2. Método HORAC (Capacidad de inhibición del radical hidroxilo)

Este método evidencia fundamentalmente la capacidad de quelar metales inhibiendo la formación de radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$), exponiendo a la muestra a un sistema generador de este tipo de radicales ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Co}^{+2}$) por medio de la reacción de Fenton a 37 °C, utilizando la fluoresceína como sonda oxidable. En este caso, las muestras con capacidad de quelar metales al inhibir la formación de radicales hidroxilos protegerán a la fluoresceína de la degradación oxidativa, inhibiendo o disminuyendo la pérdida de fluorescencia (J. Moore, Yin, & Yu, 2006). Para el análisis se empleó el método descrito por Ou et al. (2002) y J. Moore, Yin, & Yu (2006), con modificaciones establecidas por Orsini, Galleano, Añón, & Tironi (2015). Se mezclaron 20 μl de muestra o de buffer PBS (control negativo) con 190 μL de solución de fluoresceína (60,3 mM), 15 μL de H_2O_2 (0,75 M) y 75 μL de solución de cobalto (ácido picolínico 0,2 mg/mL; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,22 mg/mL). La reacción se llevó a cabo a 37 °C y las lecturas de fluorescencia (λ_{exc} : 485 nm, λ_{em} : 535 nm) se realizaron cada minuto durante 3 h en un lector de microplacas Synergy HT-Siafrt (Biotek Instruments, Vermont, USA). Para cada muestra y blanco (sin solución de cobalto y H_2O_2), se calcularon las diferencias de las áreas bajo la curva de descenso de fluorescencia. Además, se realizó una curva de calibración con ácido clorogénico en concentraciones entre 50 y 500 $\mu\text{g/mL}$,

expresando los resultados como μg de ácido clorogénico equivalente (ACE)/g de proteína, y como la concentración de proteína que inhibe 50% de los radicales hidroxilos (IC_{50}).

3.6.1.3. Método ABTS (Captación de captación del catión radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$)

El método ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) mide la capacidad antioxidante que tiene un componente en reducir el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por medio de la transferencia de electrones, ocasionado un descenso en la absorbancia (732 nm) de dicho radical cromóforo (Re et al., 1999). La actividad captadora de radicales libres se determinó por medio del método descrito por Re et al. (1999), en el cual se cuantificará la decoloración del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, generado por la reacción de oxidación del ABTS (7 mM) con persulfato de potasio (2,45 mM). Para esto, reaccionaron 100 μl de muestra o estándar (Trolox) con 1 mL de solución $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (pH 7,4) durante 60 min en oscuridad. Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a 732 nm. Se preparó una curva de calibración usando diferentes concentraciones de Trolox (0 a 300 $\mu\text{moles/L}$), expresando los resultados en μmoles equivalente de Trolox (ET)/g de proteína y en concentración de proteína que neutraliza el 50% de los radicales (IC_{50}).

3.6.1.4. Método FRAP (Poder antioxidante férrico reductor)

Este método mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el hierro férrico. Se basa en la reducción del complejo de hierro férrico y cloruro de 2,3,5-trifenil-1,3,4-triaza-2-azoniaciclopenta-1,4-dieno (TPTZ) a la forma ferrosa en medio ácido. Esta reducción se controla midiendo el cambio en la absorción a 595 nm (Pulido, Bravo, & Saura-Calixto, 2000). Se llevó a cabo con la metodología descrita por Pulido, Bravo, & Saura-Calixto (2000) con algunas modificaciones. Para esto, se mezclaron 30 μl de muestra o estándar (Trolox) con 900 μl del reactivo FRAP (TPTZ 10 mM, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, buffer acetato 0,3 M, pH 3.6) y 90 μl de H_2O destilada. La reacción se realizó a 37 °C durante 30 min en oscuridad. Posteriormente, se midió la absorbancia a 595 nm. Se preparó una curva de calibración usando diferentes concentraciones de Trolox (0 a 500 μM), expresando los resultados en

µmoles equivalente de Trolox (ET)/g de proteína y en concentración de proteína que neutraliza el 50% de los radicales (IC₅₀).

3.6.2. Actividad Inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)

Se determinó la capacidad de inhibir la ECA de las proteínas y péptidos presentes en los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris (HT), cuyo principio básico se explicó en el capítulo 2, numeral 2.4.2. Para esto, se empleó el método descrito por Terashima et al. (2010). Se mezcló 10 µL de muestra con 25 µL de buffer fosfato (KH₂PO₄ 50 mM a pH 8,3) y 10 µL de solución ECA (0,2 U/mL, KH₂PO₄ 50 mM a pH 8,3). En la mezcla de reacción para el control negativo, se utilizaron 10 µL de buffer fosfato en lugar de la muestra de ensayo. Se continuó con una incubación a 37°C durante 10 min, y luego se agregó 25 µL de solución HHL (Hipuril-Histidil-Leucina, 8,3 mM HHL, 133mM KH₂PO₄ y 500mM NaCl), incubando nuevamente a 37°C durante 30 minutos. La reacción se finalizó agregando 70 µL de HCl 1M. Posteriormente, se tomaron 20 µL de la mezcla de reacción y se inyectaron a un sistema HPLC (Shimadzu, Kioto, Japón) equipado con una columna hidrófoba (Cosmosil 5C18-MS-II, 4,6 x 150 mm). Se utilizó una fase móvil isocrática de 80% H₂O bidestilada con ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v) y 20% acetonitrilo con ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v), con un flujo de 1,0 mL/min. El ácido hipúrico (AH) generado por la reacción y el HHL sin reaccionar se detectaron a 228 nm y los tiempos de retención de AH y HHL fueron de 4,5 y 21 min, respectivamente. El porcentaje de inhibición de la ECA se definió mediante la ecuación 3.35:

$$\text{Inhibición ECA (\%)} = \frac{A - B}{A - C} \times 100 \quad (3.35)$$

Donde A es la altura del pico de AH sin inhibidores de la ECA (Control negativo), B es la altura del pico de AH generado en presencia del inhibidor y C es la altura del pico de AH generado sin enzima (control correspondiente a la autólisis de HHL en el curso del ensayo enzimático). El valor de IC₅₀ de las muestras se definió como la concentración requerida para reducir el pico de ácido hipúrico en un 50% (lo que indica un 50% de inhibición de la ECA).

El inhibidor clínico de la ECA, Captopril (Control Positivo), se utilizó con fines comparativos en una concentración de 0 – 0,25 μM .

3.6.3. Actividad anticoagulante

Para determinar la actividad anticoagulante de proteínas y péptidos presentes en los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris se utilizó los ensayos *in vitro* de tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) y tiempo de protrombina (PT), ambos basados en el tiempo de coagulación. Para esto, se tomaron muestras de sangre de 4 voluntarios sanos en tubos de ensayo con solución de citrato de sodio al 3,2% (m/v). La sangre se centrifugó a 2.800 x g durante 15 min, se separó el plasma pobre en plaquetas (PPP). En ambos ensayos, los hidrolizados se emplearon a una concentración de 20 mg proteína/mL y el control se midió reemplazando el volumen de muestra por agua destilada. Los análisis se llevaron a cabo en un analizador de coagulación Coag-A-Mate XM (GMI, Nueva Jersey, USA) usando kits comerciales, según la metodología descrita por Jung & Kim (2009) con algunas modificaciones.

3.6.3.1. Tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT)

Este ensayo evalúa la vía de coagulación intrínseca y común, mediante la medición del tiempo en el que el anticoagulante retrasa la activación los factores XII, XI, X, IX y VIII, necesarios para la formación del activador intrínseco de la protrombina y fibrinógeno. Se mezclaron 70 μl de PPP con 30 μl de muestra (20 mg/mL) y se incubaron durante 2 min a 37 $^{\circ}\text{C}$. Luego, se adicionó 100 μl del reactivo APTT y se incubaron nuevamente por 5 min a 37 $^{\circ}\text{C}$. El tiempo de coagulación en segundos, se registró luego de agregar 100 μL de CaCl_2 (25 mM).

3.6.3.2. Tiempo de protrombina (PT)

Este ensayo evalúa el tiempo en el que el anticoagulante retrasa la activación de la protrombina, factor V, VII y X presentes en la vía de coagulación extrínseca y común. Para

el ensayo, 70 μL de PPP fueron incubados con 30 μL de la muestra (20 mg/mL) a 37 °C por 3 min. El tiempo de coagulación se registró luego de la adición de 200 μL de reactivo PT.

3.7. Evaluación de la bioaccesibilidad

Se evaluó la bioaccesibilidad de las proteínas y péptidos de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris por medio de modelos de digestión gastrointestinal (GI) *in vitro* y cultivos celulares (Caco-2/TC7).

3.7.1. Simulación de la Digestión Gastrointestinal

3.7.1.1. Método estandarizado de digestión estática in vitro

Las vísceras de trucha arcoíris (VT) y su hidrolizado óptimo (HT), fueron sometidos a digestión gastrointestinal *in vitro* con el objetivo de evaluar la estabilidad de las proteínas presentes en las muestras, según el método descrito por Minekus et al. (2014). Se inició con la fase oral, donde se mezclaron 2,5 g de muestra con 6 mL de fluido salival simulado (KCl 15,1 mM, KH_2PO_4 3,7 mM, NaHCO_3 13,6 mM, MgCl_2 0,15 mM, NH_4HCO_3 0,07 mM; pH 7), 0,5 mL de α -amilasa (57,4 U/mg), 25 μL de CaCl_2 (0,3M) y 975 μL de H_2O destilada, y se incubaron durante 2 min a 37 °C con agitación constante. Luego se continuó con la fase gástrica, donde se agregó 7,5 mL de fluido gástrico simulado (KCl 6,9 mM, KH_2PO_4 0,9 mM, NaHCO_3 25 mM, NaCl 47,2 mM y MgCl_2 0,1 mM, NH_4HCO_3 0,6 mM; pH 3), 1,6 mL de pepsina (2.000 UA/mL) y 5 μL de CaCl_2 (0,3M) y se incubó con agitación durante 2h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se realizó la fase intestinal, donde se agregó fluido intestinal simulado (KCl 6,8 mM, KH_2PO_4 0,8 mM, NaHCO_3 85 mM, NaCl 38,4 mM y MgCl_2 0,33 mM; pH 7), 5,0 mL de pancreatina (100 U/mL), 2,5 mL de bilis (10 mM) y 40 μL de CaCl_2 , se continuo con incubación a 37 °C durante 2 h en agitación constante. Finalmente se inactivaron las enzimas por calentamiento a 85 °C durante 10 min. Los digeridos fueron liofilizados y conservados a 4 °C, y su contenido proteico se determinó usando la técnica de Micro-Kjeldahl.

3.7.1.2. Determinación del grado de hidrólisis por el método TNBS

Se determinó el grado de hidrólisis de las vísceras de trucha arcoíris digeridas (VTD) y su hidrolizado óptimo digerido (HTD) mediante el método del ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS), descrito por Adler-Nissen, (1979). Se preparó diluciones de las muestras a 1 mg/mL en buffer fosfato 0,2125 M (pH = 8,2 con SDS 1% m/v) y se incubaron a 75°C durante 15 min. Luego, se tomaron 63 µl de muestra se mezclaron con 500 µL buffer fosfato 0,2125 M (pH = 8,2 sin SDS) y solución de TNBS 0,05 % m/v, se incubaron en oscuridad durante 1 hora a 50°C. La reacción se detuvo con HCl 0,1 N. Se midió la absorbancia a 340nm y se utilizó L-leucina (ácido L-2-amino-4-metilpentanoico) como patrón para la curva de calibración, en concentraciones entre 0,225 y 2,25 mM. El grado de hidrólisis (GH) se calculó a través de la ecuación 3.36:

$$GH = \frac{[-NH_2]_t - [-NH_2]_0}{([-NH_2]_\infty - [-NH_2]_0)} \times 100 \quad (3.36)$$

Donde $[-NH_2]_t$ indica la concentración de grupos amino liberados en el tiempo t (muestra hidrolizada), $[-NH_2]_0$ es la concentración de grupos amino liberados en el tiempo 0 (muestra sin hidrolizar), $[-NH_2]_\infty$ es la concentración total de grupos a-amino obtenidos después de una hidrólisis ácida completa (muestra hidrolizada completamente). El valor de $[-NH_2]_\infty$ fue estimado a través de la siguiente ecuación:

$$[-NH_2]_\infty = \frac{I}{\overline{PM}_{aa}} \times (1 + f_{Lys}) \times C_{prot} \quad (3.37)$$

Donde \overline{PM}_{aa} es el promedio de pesos moleculares de los aminoácidos en las proteínas de vísceras de trucha arcoíris, f_{Lys} es la proporción de lisina en estas proteínas y C_{prot} es la concentración de proteínas en la muestra.

3.7.2. Simulación de la absorción intestinal

Se realizó una simulación de la absorción intestinal de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris, los digeridos gastrointestinales y las fracciones con mayor bioactividad, usando células Caco-2/TC7.

3.7.2.1. Cultivo de células Caco-2/TC7

Las células provenientes del epitelio colorrectal de adenocarcinoma humano, Caco-2/TC7 pasajes 39 - 40 del cultivo ATCC (American Type Culture Collection, Maryland, USA), fueron cultivadas en cajas plásticas de 25 cm² a 37 °C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂ en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado con 15% (v/v) de suero fetal bovino (SFB), 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales y 1% (v/v) de solución antibiótica (penicilina- estreptomycin). Las células se incubaron hasta alcanzar la confluencia (alrededor de 7 días). Se trataron con tripsina utilizando tripsina-EDTA en buffer PBS y se suspendieron nuevamente en DMEM con 15% de SFB. Se realizó un recuento del número de células totales por mL en un microscopio invertido. Finalmente, de acuerdo con el análisis a realizar, se diluyeron las células a la concentración deseada y se sembraron en placas o en insertos.

3.7.2.2. Ensayo de citotoxicidad celular

Se determinó la citotoxicidad de las muestras a partir del ensayo LDH (enzima lactato deshidrogenasa), utilizando un kit comercial. Este ensayo se basa en la cuantificación de la actividad enzimática de LDH en el medio celular, debido a que un incremento de esta en el sobrenadante del cultivo es proporcional al número de células lisadas o dañadas (Parhamifar, Andersen, & Moghimi, 2013). La liberación de LDH de las células muertas o severamente dañadas cataliza la oxidación de NADH a NAD⁺ ocasionando una caída en la absorbancia a 340 nm. Para esto, se sembraron las células Caco-2/TC7 en placas de 96 pocillos a una densidad de 2,5 x 10⁴ células/pocillo. Una vez que el cultivo celular llegó a confluencia se agregó 100 µl de cada una de las muestras a diferentes concentraciones (0, 5 - 5 mg/mL para HT, HTD, VTD y 1 mg/mL para las fracciones del proceso de ultrafiltración), además de

DMEM con Tritón X-100 3% (v/v) como control positivo de muerte celular. Posteriormente, se incubaron a 30 °C durante 3 h. transcurrido este tiempo se retiró 2,5 µL de sobrenadante y se mezclaron con 150 µL de Reactivo A reconstituido (piruvato 0,6 mM y NADH 0,18 mM). La reacción se monitoreó cada 30 s durante 3 min midiendo la absorbancia a 340 nm usando un lector de microplacas Synergy HT-SIAFRT (Biotek Instruments, Vermont, USA). La actividad enzimática de LDH (U/L) se expresó como la variación de absorbancia por min ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$) calculando el promedio de la diferencia en las absorbancias por minuto, a los tiempos 0,5, 1,5, 2,5 y 3,0 min, el cual se multiplicó por el factor de corrección dependiente de la temperatura de trabajo según las especificaciones del fabricante ($f = 9.683$ a 30 °C). Así, la citotoxicidad se cuantificó en términos del porcentaje de liberación de LDH (ecuación 3.38):

$$\text{LDH (\%)} = \frac{\text{LDH}_{\text{Muestra}}}{\text{LDH}_{\text{Total}}} \times 100 \quad (3.38)$$

Donde $\text{LDH}_{\text{Muestra}}$ es la actividad enzimática de LDH (U/L) obtenida del tratamiento de las células Caco-2/TC7 con las muestras analizadas y $\text{LDH}_{\text{Total}}$ es la actividad enzimática de LDH (U/L) del Control positivo de muerte celular.

3.7.2.3. Monocapa de células Caco-2/TC7

Para la obtención de monocapas celulares confluentes, se sembraron 200 µl de suspensión de células Caco-2/TC7 provenientes de cultivos confluentes (numeral 3.7.2.1) en insertos de policarbonato de 12 mm de diámetro y 0,4 µm de tamaño de poro (Millipore Merck, Massachusetts, USA), en una concentración de 1×10^5 células/cm², y se adicionó 600 µl de DMEM en el pozo (cámara basolateral). Se incubó a 37 °C (5% de CO₂), cambiando el medio de cultivo de ambas cámaras (apical y basolateral) cada dos días durante al menos 21 días hasta que las células Caco-2/TC7 se diferenciaron completamente como monocapas. En cada cambio de medio, se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TEER, $\Omega \cdot \text{cm}^2$) para evaluar la confluencia e integridad de las monocapas, utilizando un voltímetro Millicell-ERS

(Millipore Merck, Massachusetts, USA). Una vez que se formó la monocapa (TEER constante), se procedió con el ensayo de actividad transportadora en la monocapa celular.

3.7.2.4. Determinación de la actividad transportadora

La actividad transportadora fue determinada en dirección apical a basolateral como se describe en el capítulo 2, numeral 2.6.2. Una vez formada la monocapa (TEER constante), se adicionaron 400 μ L de Buffer PBS (pH 7,4) en las cámaras apical y basolateral del inserto y se incubaron durante 20 min en estufa a 37°C (5% de CO₂) con el fin de estabilizar los insertos. Transcurrida dicha incubación, se removió el buffer PBS de ambas cámaras, se sembraron 400 μ l de las muestras en estudio en la cámara apical y 400 μ l de buffer PBS en la cámara basolateral, incubando durante 3 horas a 37 °C. Posteriormente, Se tomaron muestras de ambas cámaras y se inyectaron a un sistema HPLC (Waters, Massachusetts, USA) equipado con una columna analítica (Sephasil Peptide C8, 4.6 x 250 mm, 12 μ m) y un detector de arreglo de diodo (DAD). Para la corrida se utilizaron dos fases móviles, el solvente A fue una mezcla de H₂O – acetonitrilo (98:2) con TFA (0,065% v/v), mientras que el solvente B estuvo compuesto por una mezcla de H₂O – acetonitrilo (35:65) con TFA (0,065% v/v). Las muestras fueron eluidas con un gradiente lineal del solvente B en A (0 a 100% en 55 min, con un flujo de 1,1 mL/min), con un sistema de detección a 210 y 280 nm.

3.8. Fraccionamiento de Hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris

3.8.1. Fraccionamiento por membranas de ultrafiltración

Se realizó un fraccionamiento de los hidrolizados que presentaron mayores actividades biológicas mediante un proceso de ultrafiltración en serie utilizando membranas Amicon ultra 15 de celulosa regenerada (Millipore Merck, Massachusetts, USA), con un peso molecular de corte (MWCO) de 100 kDa, 10 kDa y 3 kDa. En el proceso de ultrafiltración en serie, se empleó el método de recolección del retenido, de manera que el hidrolizado (20 mg/mL) pasó primero a través de la membrana de mayor MWCO, y su permeado pasó a través de la siguiente membrana y así sucesivamente hasta pasar por la membrana de menor tamaño (Figura 3.3). En cada etapa de ultrafiltración se centrifugó a 5.000 x g durante 20 min

a 10 °C y se obtuvieron las fracciones correspondientes, las cuales fueron posteriormente liofilizadas.

3.8.2. Separación Cromatografía de exclusión molecular (FPLC)

Fracciones solubles en buffer PBS (pH = 7,4) de los digeridos de las vísceras de trucha arcoíris (VTD) y de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris (HTD), fueron separadas mediante FPLC utilizando una columna semi-preparativa de exclusión molecular Superdex Peptide 10/300 (límite de exclusión 10 kDa, GE Healthcare), en un equipo ÄKTA Purifier (GE Healthcare, Illinois, USA), empleando el método descrito en el numeral 3.3.9. Se colectaron fracciones cada 0,5 mL a partir del V_0 , obteniéndose un total de 36 fracciones.

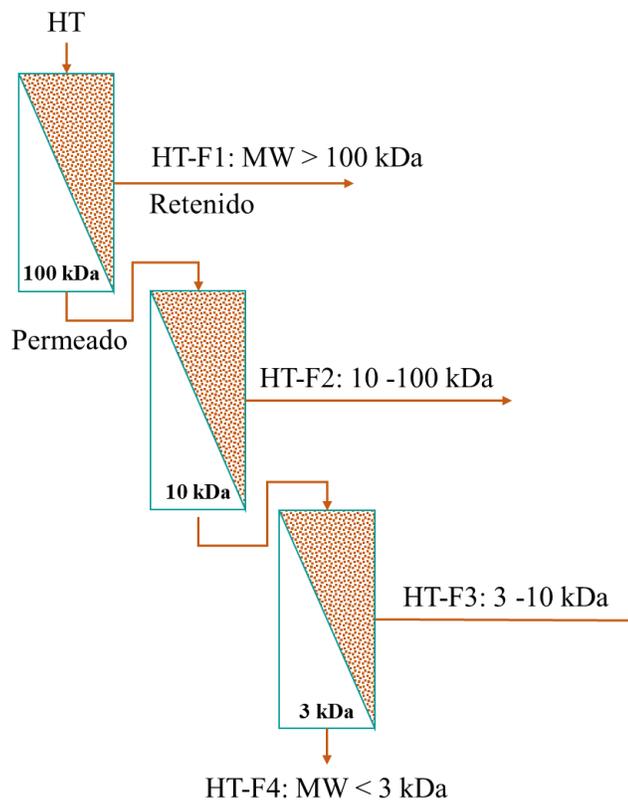


Figura 3.3. Secuencia de ultrafiltración con las fracciones de hidrolizado obtenidas.

3.9. Evaluación de Propiedades Funcionales

Se determinó la solubilidad de las proteínas, las propiedades emulsificantes y espumantes de los hidrolizados obtenidos a las condiciones óptimas a diferentes valores de pH y tiempos de reacción, asegurando así, también la evaluación de las propiedades funcionales a diferentes GH.

3.9.1. Solubilidad de proteínas

La solubilidad de las proteínas de los hidrolizados se determinó de acuerdo con el método descrito por Choi, Hur, Choi, Konno, & Park (2009), con algunas modificaciones. Se prepararon soluciones de los hidrolizados a una concentración de 10 mg/mL y se ajustó el pH a 4,0; 7,0 y 10,0 utilizando HCl 1 M y NaOH 1M. Posteriormente, se centrifugaron a 4.000 rpm durante 20 min y se recolectó la fracción soluble (sobrenadante). Finalmente, se determinó el contenido de proteína del sobrenadante por el método de Lowry & Randall (1951) descrito en el numeral 3.3.1.3 y se calculó el porcentaje de solubilidad de las muestras de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Solubilidad (\%)} = \frac{\text{proteína en el sobrenadante}}{\text{proteína total en la muestra}} \times 100 \quad (3.39)$$

3.9.2. Propiedades emulsionantes

Se determinaron las propiedades emulsionantes como índice de actividad emulsionante (IAE) e índice de estabilidad de la emulsión (IEE), según el método de Pearce & Kinsella (1978), con algunas modificaciones descritas por Liu et al. (2014). Se prepararon soluciones de hidrolizado con concentración de proteína (c) de 0,005 g/mL y se ajustó el pH de cada muestra a 4,0; 7,0 y 10,0. Luego, se mezcló 45 mL de solución de hidrolizado con 15 mL de aceite de girasol, representando una fracción de aceite de 0,25. Se homogenizaron a una velocidad de 18.000 rpm durante 1 min, utilizando un homogeneizador OV5 (VELP Scientifica, Monza, Italia). Se tomaron 20 μ L de la emulsión al tiempo cero y a los 10 minutos de formada la emulsión, y se diluyeron con 2 mL de SDS al 0,1% (m/v). Posteriormente, se

midió la absorbancia de las muestras tomadas en ambos tiempos a 500 nm en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), obteniéndose las absorbancias A_0 y A_{10} respectivamente, utilizadas para calcular IAE y IEE, según las ecuaciones 3.40 y 3.41, respectivamente:

$$\text{IAE (m}^2\text{/g)} = \frac{2 \times 2,303 \times A_0}{c \times 0,25} \times 100 \quad (3.40)$$

$$\text{IEE (min)} = \frac{A_0 \times 10}{A_0 - A_{10}} \quad (3.41)$$

3.9.3. Propiedades espumantes

Se midieron las propiedades espumantes de los hidrolizados, tales como capacidad espumante (CE) y estabilidad de la espuma (EE), de acuerdo con el método de Coffmann & Garcia (1977) con ligeras modificaciones. Se tomaron 50 mL de hidrolizado con una concentración de proteína de 10 mg/mL y se ajustó el pH a 4,0; 7,0 y 10,0. Las muestras se homogeneizaron a 18.000 rpm a una temperatura de 25°C durante 1 min, utilizando un homogeneizador OV5 (VELP Scientifica, Monza, Italia). Se registró el volumen total después del batido y al transcurrir 10 minutos, con el objetivo de calcular la capacidad de formación de espuma y la estabilidad de la espuma de acuerdo con las ecuaciones 3.42 y 3.43, respectivamente:

$$\text{CE (\%)} = \frac{V_2 - V_1}{V_1} \times 100 \quad (3.42)$$

$$\text{EE (\%)} = \frac{V_3 - V_1}{V_1} \times 100 \quad (3.43)$$

Donde V_1 es el volumen antes del batido (mL), V_2 es el volumen después del batido (mL) y V_3 el volumen después de transcurridos 10 minutos (mL).

3.10. Análisis Estadístico

Las mediciones se realizaron por triplicado para cada muestra en todos los experimentos y los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar de al menos dos experimentos realizados por separado. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA). Cuando las diferencias fueron significativas ($p < 0,05$), los valores medios se evaluaron mediante la prueba HSD de Tukey, utilizando Statgraphics® Centurion XVI (Statgraphics Technologies Inc., USA).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de las vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y sus hidrolizados enzimáticos

4.1.1. Pretratamiento de las vísceras de trucha arcoíris

Con el objetivo de remover la mayor cantidad de lípidos presentes en las vísceras de trucha arcoíris, concentrar la proteína, evitar la oxidación y coloración del hidrolizado final (Benjakul et al., 2014; Kristinsson, 2007), se evaluaron tres procesos de desengrasado por calentamiento, según lo establecido en el capítulo Metodología, ítem 3.1. Se calculó el porcentaje de extracción de grasa para cada uno de los pretratamientos evaluados (Figura 4.1), obteniéndose con el pretratamiento 1 un porcentaje de extracción del $10,6 \pm 0,3$ %, seguido de un $8,4 \pm 0,2$ % con el pretratamiento 2 y un $3,2 \pm 0,2$ % con el pretratamiento 3.



Figura 4.1. Extracción de lípidos de las vísceras de trucha arcoíris.

El análisis de varianza simple demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre las medias de los pretratamientos evaluados, por lo cual, se seleccionó el pretratamiento 1 (90 °C, 20 min) como etapa previa a la hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris, debido a que se obtuvo un mayor porcentaje de extracción de grasa en comparación con el resto de los procesos. Si bien, la mayoría de los pretratamientos utilizados para extraer la grasa de los subproductos de pescado son métodos de extracción con solventes, en el caso de las vísceras, el tratamiento térmico es una práctica muy convencional, ya que tiene el doble propósito de inactivar las enzimas endógenas y extraer la grasa presente (Villamil et al., 2017).

4.1.2. Composición proximal

La composición proximal de las vísceras de trucha arcoíris frescas (V) y desengrasadas (VT) se presenta en la Tabla 4.1. En el caso de las vísceras frescas, estas presentaron un porcentaje de humedad del $62,42 \pm 0,26\%$, el cual se encuentran dentro del rango de humedad (60 – 72%) reportado para algunas vísceras de especies acuícolas, como salmón (*Salmo salar*) (Opheim et al., 2015), tilapia roja (*Oreochromis sp.*) (Gómez & Zapata, 2017) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Taheri et al., 2013). El proceso de desengrasada logro disminuir el porcentaje de lípidos de las vísceras de trucha arcoíris frescas del 25,40 a 5,09%, alcanzándose una disminución aproximada del 80%, lo cual es menor al porcentaje de disminución encontrado por Gómez & Zapata (2017), el en proceso de desengrasado de vísceras de tilapia roja (*Oreochromis sp.*). No obstante, se logró concentrar la proteína, al pasar de un 8,31% en las vísceras frescas a un 12,63% en las vísceras desengrasadas. Sin embargo, el contenido de proteína de las vísceras frescas fue inferior al reportado por Taheri et al. (2013) para la misma materia prima el cual fue del 15%, esto puede deberse a que la composición proximal de los órganos animales varía con respecto al tamaño y madurez sexual del pescado, condiciones nutricionales, temperatura de crecimiento y temporada de pesca (Lopes de Souza, Petenuci, Camparim, Visentainer, & Inhamuns da Silva, 2020; Noman et al., 2018).

Tabla 4.1. Composición proximal de las vísceras de trucha arcoíris

Muestra	Proteína* (%)	Lípidos* (%)	Ceniza* (%)	Humedad (%)
V	$8,31 \pm 0,33^a$	$25,40 \pm 0,25^a$	$1,92 \pm 0,02^a$	$62,42 \pm 0,26^a$
VT	$12,63 \pm 0,62^b$	$5,09 \pm 0,19^b$	$3,77 \pm 0,04^b$	$76,94 \pm 0,27^b$

* Valores reportados en base húmeda.

^{a-b} Diferentes letras en la misma columna, indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

4.1.3. Calidad microbiológica

Los resultados del estado microbiológico de las vísceras frescas (V) y de las vísceras procesadas (VT) que se usaron para la elaboración de los hidrolizados enzimáticos se muestran en la Tabla 4.2. Debido a la elevada actividad de agua, pH próximo a la neutralidad (6,3 - 6,8) y a la gran cantidad de nutrientes, las vísceras de trucha arcoíris se convierten en un medio ideal para el crecimiento microbiano, siendo necesario aumentar las precauciones en cuanto a su manejo, transporte y conservación para así mitigar su deterioro por los microorganismos presentes, y a su vez evitar cualquier tipo de contaminación microbiológica adicional. No obstante, los resultados sobre microorganismos patógenos (*E. coli*, *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae*) cumplen con los límites máximos permitidos por la reglamentación colombiana para la especie trucha arcoíris (NTC-5443, 2015).

Tabla 4.2. Calidad microbiológica de vísceras de trucha arcoíris

Microorganismo	V	VT	Patrón Microbiológico**
Bacterias aerobias mesófilas	4,7 x 10 ⁴ UFC/g	7,0 x 10 ³ UFC/g	N/E
Coliformes totales	460 NMP/100g	93 NMP/100g	N/E
<i>Escherichia coli</i>	4 NMP/100g	< 3 NMP/100g	m = 10 M = 400 (n = 5, c = 2)
<i>Salmonella sp.</i>	Ausencia/25g	Ausencia/25g	Ausencia/25g
<i>Vibrio cholerae</i>	Ausencia/25g	Ausencia/25g	Ausencia/25g
Mohos y Levaduras	3,5 x 10 ³ UFC/g	7,3 x 10 ³ UFC/g	N/E

** De acuerdo con NTC 5445 de 2015

UFC: Unidades Formadoras de Colonias, NMP: Número más probable de bacterias.

N/E: no establecido.

Asimismo, se pudo observar que el pretratamiento realizado a las vísceras de trucha arcoíris disminuyó la carga microbiológica, tanto en bacterias aerobias mesófilas pasando de 4,7 x 10⁴ UFC/g en V a un 7,0 x 10³ UFC/g en VT; como en bacterias coliformes. Pese a

ello, se observó una mayor cantidad de mohos y levaduras en las vísceras procesadas, lo cual puede deberse a las condiciones ambientales del laboratorio o a los equipos utilizados en el momento del procesamiento de las vísceras. Sin embargo, actualmente no existe una normatividad que establezca los parámetros máximos permitidos para este tipo de microorganismo en los subproductos acuícolas.

4.1.4. Contenido de metales pesados

Debido a que Colombia sufre actualmente uno de los mayores problemas por contaminación ambiental gracias al uso desmedido de sustancias químicas para el aprovechamiento de minerales, mala disposición de aguas servidas, además de prácticas industriales y agrícolas inadecuadas en cuerpos de aguas fundamentales para la dinámica poblacional de animales y vegetales (Lopez-Barrera & Barragan-Gonzalez, 2016; Vargas-Licon & Marrugo-Negrete, 2019). Se determinó el contenido de metales pesados (Hg, Pb, Cd y As) en las vísceras de trucha arcoíris procesadas y desengrasadas (Tabla 4.3). Si bien, no existe una normatividad para establecer los límites máximos permitidos en subproductos de pescado, se encontró que los niveles de mercurio presentes en las vísceras de trucha arcoíris son inferiores a los límites máximos establecidos tanto por la Unión Europea (Reglamento-582, 2016) como por la normatividad colombiana vigente (NTC-5443, 2015) de 0,50 mg/kg peso fresco para consumo humano, contrario a la concentración de plomo la cual superó el límite máximo permitido para músculo de pescado establecido por dichas reglamentaciones. No obstante, a la hora de realizar la hidrólisis enzimática, las vísceras de trucha arcoíris son diluidas para ser utilizadas en la reacción, obteniéndose concentraciones de Pb por debajo de los límites máximos permitidos por la reglamentación vigente, lo cual será comprobado y establecido en la caracterización de los hidrolizados de VT, como se presenta más adelante. En el caso del cadmio, se observa que los niveles detectados ($< 0,08$ mg/kg) son ligeramente superior a los límites permitidos. En cuanto al nivel de arsénico total, tanto la Unión Europea como Colombia no han establecido un límite máximo permitido para productos de pescado.

En estudio realizado por Gallego-Rios, Ramirez-Botero, Lopez-Marin, & Velasquez-Rodriguez (2018), reportaron concentraciones de 0,81 mg Hg/kg, 7,8 mg Pb/kg y 0,102 mg Cd/kg en vísceras de jurel de aleta amarilla (*Caranx hippos*) del Golfo de Urabá, las cuales fueron superiores a las encontradas para vísceras de trucha arcoíris. Sin embargo, en ambas especies el nivel de plomo es más alto que el límite máximo permitido, lo que fue atribuido a las altas concentraciones de este metal en el agua en la que viven dichas especies, ya que están en contacto directo con él. Por su parte, Vergara-Estupiñán & Rodríguez-Africano (2015), encontraron concentraciones inferiores de plomo (0,287 mg/kg) en hígado de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) del río Chicamocha.

Tabla 4.3. Contenido de metales pesados en vísceras de trucha arcoíris

Parámetro	Concentración (mg/kg)	Límite máximo permitido (mg/kg)**
Hg	0,032 ± 0,001	0,50
As	< LD	N/E
Pb	6,441 ± 0,532	0,30
Cd	< LD	0,05

** De acuerdo con el Reglamento 582/2016 de la Comisión de la Unión Europea
LD: Límite de detección (As < 0,200 mg/kg; Cd < 0,08 mg/kg).
N/E: no establecido.

4.1.5. Número total de enlaces peptídicos (h_{tot})

Por medio de la composición de los aminoácidos presentes en las vísceras de trucha arcoíris, se encontró que su peso molecular promedio es de 127,56 g/mol, que de acuerdo con lo en el numeral 3.4.4. del capítulo Metodología, se determinó que el número total de enlaces peptídicos (h_{tot}) es de 7,84 mmol/g de proteína. Valor que se encuentra dentro del rango de valores publicados para proteínas de pescado. Como el h_{tot} reportado para vísceras de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) de 8,22 mmol/g (Gómez, Gómez, Pereañez, & Zapata, 2019), y para músculo de salmón (*Salmo salar*) de 7,501 mmol/g (Kristinsson & Rasco, 2000b) y 8,09 mmol/g (Valencia et al., 2014).

4.2. Optimización de la hidrólisis enzimática de las vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa® 2.4L

4.2.1. Efecto de pH y temperatura en la actividad proteolítica de la Alcalasa® 2.4L

Con el objetivo de evaluar el efecto del pH y T sobre la actividad proteolítica (AP) de la Alcalasa® 2.4L, se utilizó un diseño factorial compuesto central (CCFD), cuyas corridas experimentales se presentan en la Tabla 4.4. Se puede observar que AP tuvo un valor mínimo de 8,45 UA/g y un máximo de 11,25 UA/g en los puntos 1 y 11 del diseño, respectivamente. Asimismo, en la Tabla 4.5, se presenta el análisis de varianza (ANOVA) que muestra el efecto de las variables independientes (pH y T) sobre AP. A partir de este, se eligió un modelo polinomial de segundo orden (ecuación 4.1), donde solo se tuvieron en cuenta los términos significativos ($p < 0,05$) y cuyos coeficientes se calcularon utilizando un análisis de regresión múltiple. La bondad de ajuste del modelo se evaluó a partir de los coeficientes de correlación y determinación. En este caso, el coeficiente de determinación ajustado (R_{adj}^2) fue de 0,8436, lo que indica que el modelo de segundo orden muestra un buen ajuste con los datos experimentales, y que este podría explicar el 84% de la variabilidad en el comportamiento dentro del rango de valores estudiados.

Tabla 4.4. Niveles de las variables independientes con los valores observados para la variable respuesta, actividad proteolítica (AP)

Experimento	pH	T (°C)	AP (UA/g)
1	9,5	50	8,45
2	8,5	40	10,11
3	8,5	50	10,12
4	7,5	50	8,95
5	8,5	60	10,89
6	7,5	60	9,77
7	9,5	60	9,67
8	8,5	50	10,87
9	7,5	40	8,51
10	9,5	40	8,58
11	8,5	50	11,25

Tabla 4.5. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable respuesta, actividad proteolítica (AP).

Fuente	Suma de cuadrados	GI [‡]	Media cuadrática	Razón-F	Valor p
Modelo	9,21	3	3,07	18,98	0,0010**
T	1,64	1	1,64	10,12	0,0155*
pH	0,046	1	0,046	0,28	0,6108
pH ²	7,52	1	7,52	46,55	0,0002**
Residual	1,13	7	0,16		
Falta de ajuste	0,46	5	0,093	0,28	0,8930
Error	0,67	2	0,33		
Total	10,34	10			
R^2	0,8905				
R_{adj}^2	0,8436				

‡ Grados de libertad.

* $p < 0,05$.

** $p < 0,01$.

$$AP = -0,125 + 5,871 \times 10^{-5} T + 0,032 \text{ pH} - 1,867 \times 10^{-3} \text{ pH}^2 \quad (4.1)$$

Como se puede ver en los resultados de la tabla ANOVA (Tabla 4.5), el término cuadrático de pH tuvo un efecto significativo relativamente mayor ($p = 0,0002$) en comparación con el término lineal de T ($p = 0,0155$). Asimismo, las interacciones entre los factores no influyeron significativamente ($p > 0,05$), al igual que el término lineal del pH, sin embargo, este término no puede eliminarse del modelo, por orden de jerarquía. El modelo fue significativo ($p = 0,001$), en contraste con la falta de ajuste, que no fue significativo ($p = 0,893$), indicando que el modelo es lo suficientemente preciso para predecir la actividad proteolítica de la Alcalasa® 2.4L para cualquier combinación de variables experimentales independientes. En el gráfico de superficie de respuesta para AP en función del pH y la temperatura (Figura 4.2), se puede observar que la actividad proteolítica posee un máximo

en función del pH en el rango de 8,0 – 9,0; además, de aumentar a medida que aumenta la temperatura. Asimismo, se optimizó la ecuación del modelo (ecuación 4.1) para maximizar la variable respuesta (AP), encontrándose que valores de pH = 8,5 y T = 60 °C arrojaban un valor máximo predicho para AP de 11,17 UA/g, mientras que el valor de AP obtenido experimentalmente fue $11,78 \pm 0,25$ UA/g (promedio de tres ensayos), alcanzando un error relativo de 5,18%.

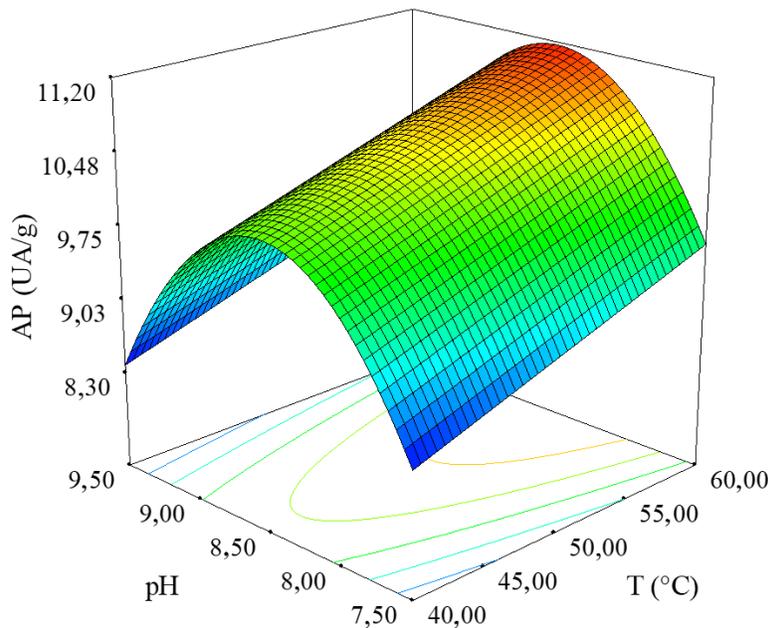


Figura 4.2. Superficie de respuesta para AP en función del pH y la temperatura.

Por otra parte, algunos autores encontraron las mismas condiciones óptimas de pH y temperatura para la hidrólisis de proteínas de pescado con Alcalasa® 2.4L. Normah, Jamilah, Saari, & Yaakob (2005), informaron que la hidrólisis de músculo de besugo (*Nemipterus japonicas*) con Alcalasa® 2.4L fue óptima a 60 °C y pH 8,5. Por su parte, Benjakul y Morrissey (1997) encontraron que la Alcalasa® 2.4L presentó una alta actividad en la hidrólisis de subproductos (cabeza, piel, hueso, víscera y tejido muscular) de merlán del Pacífico (*Merluccius productus*) en un rango de pH de 8,5 - 10 con una temperatura de 60 °C. Otros autores encontraron condiciones óptimas similares, Wasswa, Tang, & Gu (2008), reportaron que los valores óptimos de temperatura y pH fueron 59,74 °C y 8,25, respectivamente, para la hidrólisis de piel de la carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*)

con Alcalasa® 2.4L. Asimismo, Ovissipour, Abedian Kenari, Motamedzadegan, & Nazari (2012), encontraron que para un pH de 8,5 en la hidrólisis de vísceras de atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) con Alcalasa ® 2.4L, la temperatura óptima era 60,4 °C.

4.2.2. Efecto de la concentración de sustrato, concentración de enzima y temperatura sobre la hidrólisis enzimática de las vísceras de trucha arcoíris.

Se determinó el efecto de la concentración de sustrato (*S*), concentración de enzima (*e*) y temperatura (*T*) sobre el grado de hidrólisis (*GH*), utilizando un diseño factorial como se describió en la sección 3.4.5 del capítulo Metodología. En la Tabla 4.6, se presenta el valor de *GH* para cada una de las corridas experimentales.

Tabla 4.6. Niveles de las variables independientes con los valores observados para la variable respuesta, grado de hidrólisis (GH).

Experimento	<i>S</i> (% m/v)	<i>e</i> (UA/g)	<i>T</i> (°C)	<i>GH</i> (%)
1	6,00	0,24	45	16,347
2	4,00	0,48	55	19,128
3	4,00	0,88	55	20,042
4	7,36	0,48	55	17,049
5	2,00	0,72	45	17,548
6	2,00	0,72	65	17,346
7	0,64	0,48	55	15,835
8	4,00	0,48	55	19,283
9	4,00	0,48	55	18,926
10	6,00	0,24	65	16,679
11	4,00	0,48	55	18,058
12	4,00	0,48	55	19,265
13	4,00	0,48	55	19,420
14	4,00	0,48	71,8	19,216
15	6,00	0,72	65	20,429
16	4,00	0,48	38,2	19,508
17	2,00	0,24	45	17,844
18	4,00	0,07	55	17,679
19	6,00	0,72	45	19,837
20	2,00	0,24	65	18,087

El efecto de las variables independientes (S , e y T) sobre el GH de la reacción enzimática de las proteínas de las vísceras de trucha arcoíris usando Alcalasa 2.4@L se muestra en la tabla ANOVA (Tabla 4.7). A partir del ANOVA se eligió un modelo polinomial de segundo orden, en el que se tuvieron en cuenta solo los términos significativos ($p < 0,05$) cuyos coeficientes fueron calculados utilizando un análisis de regresión múltiple (ecuación 4.2). La calidad del ajuste del modelo se evaluó a partir de los coeficientes de correlación y determinación. En este caso, el modelo de segundo orden mostró un buen ajuste con los datos experimentales debido a que se obtuvo un coeficiente de determinación ajustado (R_{adj}^2) de 0,9256, con una carencia de ajuste no significativa ($p = 0,9605$), lo que indica que el modelo podría explicar el 93% de la variabilidad en el comportamiento dentro del rango de los factores de hidrólisis enzimática evaluados. Asimismo, el ANOVA (Tabla 4.7) señala que tanto S y como e , tienen una fuerte influencia sobre GH, con términos significativos en el orden lineal y cuadrático para S , además de interacciones significativas entre ambas variables ($p < 0,0001$). Dichos efectos se pueden apreciar cuando se presenta el comportamiento gráfico de la ecuación 4.2 en la Figura 4.3.

Tabla 4.7. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable respuesta, grado de hidrólisis (GH).

Fuente	Suma de cuadrados	Gl[‡]	Media cuadrática	Razón-F	Valor p
Modelo	30,68	4	7,67	60,06	< 0,0001**
S	1,49	1	1,49	11,66	0,0038**
e	7,58	1	7,58	59,38	< 0,0001**
$S.e$	8,56	1	8,56	67,05	< 0,0001**
S^2	13,04	1	13,04	102,13	< 0,0001**
Residuos	1,92	15	0,13		
<i>Falta de ajuste</i>	0,68	10	0,068	0,28	0,9605
<i>Error</i>	1,23	5	0,25		
Total	32,59	19			
R^2	0,9412				
R_{adj}^2	0,9256				

‡ Grados de libertad.

* $p < 0,05$.

** $p < 0,01$.

$$GH(\%) = 17,237 + 1,016S - 5,517e + 2,155S \cdot e - 0,236S^2 \quad (4.2)$$

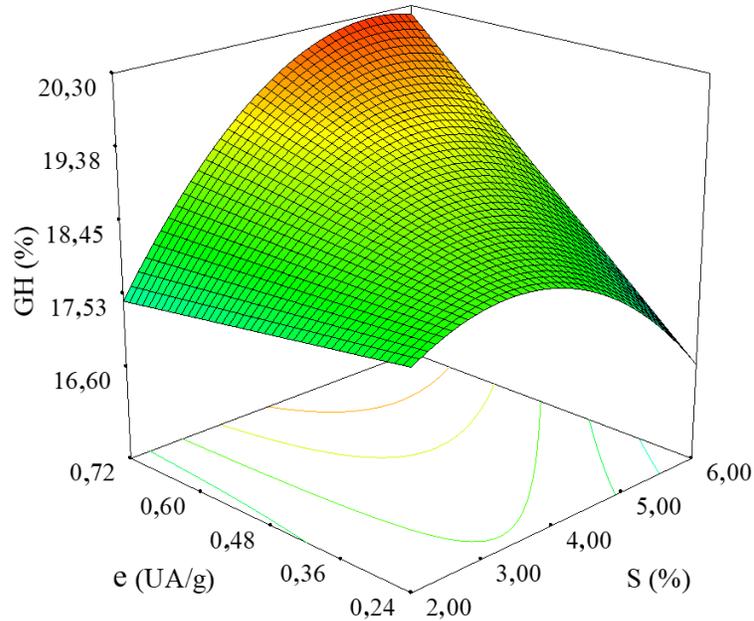


Figura 4.3. Superficie de respuesta para GH en función de la concentración de sustrato y enzima, (temperatura 60 °C).

Analizando la ecuación 4.2 se puede observar que la diferencia de signos entre el término lineal y cuadrático de S , indica que existe un punto extremo de la respuesta (GH) en función de esta variable, es decir en valores iniciales de S , se tiene un incremento de GH, pero por encima de cierto límite, los incrementos de S provocan descenso de GH, como puede verse en la Figura 4.3. Dicho punto extremo se ve afectado por la interacción de S y e , por lo que a bajos valores de e el punto extremo está cerca de valores intermedios de S , mientras que, para valores altos de e , dicho punto se encuentra más hacia los valores altos de S (alrededor del 5,45%), valores en los cuales el incremento de e favorece claramente el GH. Lo anterior indica que, si la concentración de sustrato supera un cierto valor, este va a generar algún tipo de inhibición sobre la enzima, lo cual ha sido reportado como inhibición por sustrato para Alcalasa® 2.4L en investigaciones realizadas en vísceras de tilapia roja (*Oreochromis sp.*)

(Zapata et al., 2018) y plasma de bovino (Figueroa, Zapata, & Sánchez, 2016). Dicho efecto también podría deberse a que el incremento en la concentración de sustrato por encima de cierto límite puede provocar interacciones hidrofóbicas entre moléculas del sustrato que reduzcan la accesibilidad de la enzima (Bougatef et al., 2012; Opheim et al., 2015).

Igualmente, se observa que el GH incrementa al aumentar el valor de la concentración de enzima, lo cual concuerda con diversos estudios sobre hidrólisis enzimática de proteínas de pescado (Batista, Ramos, Coutinho, Bandarra, & Nunes, 2010; Bhaskar et al., 2008). Un aumento en la concentración de enzimas tiene un efecto positivo en la proteólisis global, con mejoras posteriores en la solubilización de la proteína de pescado, además, es más probable que las proteasas se localicen cerca del sustrato, por lo que se dividen los péptidos en un grado mayor (Benjakul et al., 2014). Por otro lado, llama la atención que T no tenga efecto significativo sobre GH, lo cual puede deberse a que el efecto de T se vea eclipsado por el efecto de las otras dos variables, los cuales son significativos al 99% de confianza ($p < 0,0001$). Además, al estar trabajando en el rango de temperatura en que la enzima tiene su mejor desempeño, puede hacer que los efectos que esta variable tiene sobre GH, sean indetectables. El proceso de optimización entregó valores de $S = 5,45\%$ y $e = 0,72$ UA/g, bajo los cuales el valor predicho para GH fue 20,26%, mientras que el valor experimental de GH obtenido fue $22,49 \pm 0,42\%$ con un error relativo de 9,91%. La curva promedio obtenida para las hidrólisis realizadas a las condiciones óptimas se muestra en la Figura 4.4. Estos valores de GH están por encima de los obtenidos por Taheri et al. (2013), quienes encontraron un GH de $15,4 \pm 0,3\%$ por el método de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA), para la hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris con alcalasa. No obstante, los valores obtenidos fueron más bajos que el promedio de GH reportado por Suwal et al. (2018), el cual fue de $29,09 \pm 0,47\%$ determinado por el método de TNBS para las espinas de trucha arcoíris hidrolizadas con alcalasa. No obstante, la diferencia con estos estudios puede deberse a los métodos utilizados para la cuantificación del GH además del uso de diferentes condiciones enzimáticas.

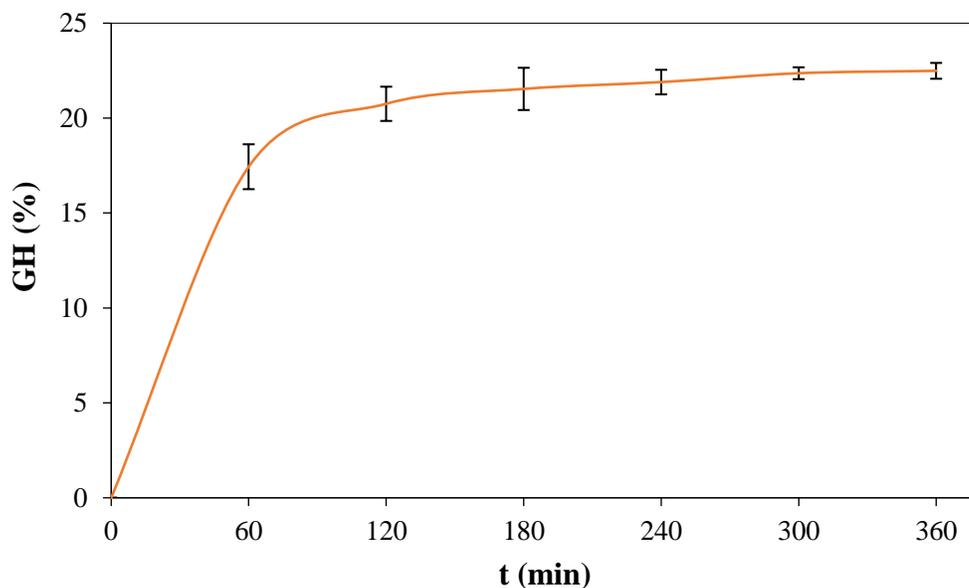


Figura 4.4. Grado de hidrólisis (GH) vs tiempo de reacción (t). $S = 5,45\%$, $e = 0,72$ UA/g, $T = 60$ °C y $pH = 8,5$. (I) desviaciones estándar.

4.2.3. Efecto de la concentración de grasa y velocidad de agitación sobre la hidrólisis enzimática de las vísceras de trucha arcoíris.

Una vez obtenidas las mejores condiciones de S , e y T para la hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L en el reactor de 0,5 L, se evaluó el efecto de la concentración de grasa (G) de las vísceras de trucha arcoíris y la velocidad de agitación (v) sobre el GH de la hidrólisis enzimática en el reactor de 7,5 L, con un volumen de trabajo de 3,5 L. En la Tabla 4.8 se presenta las 13 corridas experimentales del diseño y los valores de la variable respuesta (GH) obtenidos. En la Tabla 4.9 se muestra el análisis de varianza (ANOVA), el cual presentó un modelo polinomial de segundo orden (ecuación 4.3) altamente significativo ($p = 0,0002$), con una prueba de falta de ajuste no significativa ($p > 0,05$) indicando que el modelo es preciso para predecir el GH para cualquier combinación de variables independientes, y con un coeficiente de determinación ajustado (R_{adj}^2) de 0,8302. En el ANOVA (Tabla 4.9), se observa que la velocidad de agitación (v) presenta una mayor influencia sobre GH ($p < 0,0001$) en su término cuadrático, en comparación con el efecto que ejerce la concentración de grasa (G) en su término lineal ($p = 0,015$). Lo cual se ve reflejado

en la Figura 4.5, donde se muestra el comportamiento gráfico de la variable respuesta (GH) en función de los dos factores evaluados.

Tabla 4.8. Niveles de las variables independientes con los valores observados para la variable respuesta, grado de hidrólisis (GH).

Experimento	G (%m/m)	v (rpm)	GH (%)
1	25,46	125,00	18,36
2	15,28	100,00	17,89
3	5,09	125,00	17,08
4	15,28	135,36	15,52
5	15,28	100,00	19,06
6	5,09	75,00	15,60
7	15,28	100,00	18,57
8	15,28	64,64	15,68
9	25,46	75,00	17,20
10	25,46	100,00	20,58
11	15,28	100,00	19,82
12	15,28	100,00	19,23
13	5,09	100,00	18,55

Tabla 4.9. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable respuesta, grado de hidrólisis (GH).

Fuente	Suma de cuadrados	GI[‡]	Media cuadrática	Razón-F	Valor p
Modelo	27,99	3	9,33	20,56	0,0002**
G	4,03	1	4,03	8,87	0,0155*
v	0,73	1	0,73	1,60	0,2378
v ²	23,24	1	23,24	51,21	<0,0001**
Residual	4,08	9	0,45		
<i>Falta de ajuste</i>	1,98	5	0,40	0,75	0,6251
<i>Error</i>	2,10	4	0,53		
Total	32,07	12			
R ²	0,8727				
R _{adj} ²	0,8302				

‡ Grados de libertad.

* p < 0,05.

** p < 0,01.

En relación con el modelo ajustado (ecuación 4.3), se puede observar que v en su término lineal tiene un efecto positivo sobre el GH, contrario al término cuadrático el cual presenta un efecto negativo. Lo cual indica que, al ir aumentando v se obtiene un incremento de GH, hasta llegar a un punto límite donde el aumento de los valores de v genera un efecto negativo sobre el GH, provocando su descenso, como puede verse en la Figura 4.5. Estos resultados concuerdan con las investigaciones realizadas en vísceras de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) (Gómez & Zapata, 2017) y vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Zapata et al., 2019). Este comportamiento puede deberse a que un aumento en la velocidad de agitación, pueden llegar a favorecer el desarrollo de la reacción, posiblemente porque ayuda a mantener una mayor homogeneidad en la muestra, y así favorecer el contacto enzima-sustrato. No obstante, por encima de un cierto valor de velocidad, se ejerce un efecto negativo sobre la reacción asociado a un cambio conformacional de la Alcalasa® 2.4L, que dificulta temporalmente la interacción enzima-sustrato o conlleva a un proceso de inactivación-agregación de la enzima (Gómez & Zapata, 2017; Zapata et al., 2019).

$$GH(\%) = -12,378 + 0,080G + 0,592v - 2,899 \times 10^{-3}v^2 \quad (4.3)$$

Asimismo, se observa que al aumentar la concentración de grasa (G) se incrementa el GH, lo cual concuerda con los estudios realizados por Hoyle & Merritt (1994) en músculo arenque (*Clupea harengus*) y Klompong, Benjakul, Kantachote, & Shahidi (2007) en músculo de jurel (*Selaroides leptolepis*), en los cuales obtuvieron grados de hidrólisis más bajos para el músculo desgrasado en comparación con el músculo completo. Lo cual se debe principalmente a que las proteínas sufren un proceso de agregación por el proceso de desgrasado, especialmente por las altas temperaturas y la presencia de solventes. No obstante, en el presente estudio todas las muestras empleadas en el diseño fueron sometidas a las mismas condiciones de desengrasado, garantizando una homogeneidad y uniformidad en el tratamiento de las muestras, a las cuales posteriormente se les adicionó la cantidad de grasa necesaria para alcanzar la concentración requerida en cada corrida, y así asegurar que el diseño no fuera afectado por variables externas. Sin embargo, estos resultados encontrados en el diseño, donde a mayor concentración de grasa se obtiene mayor GH, pueden generar con el tiempo un deterioro oxidativo en el hidrolizado final, provocando alteraciones en su

calidad nutricional y organoléptica (Aspevik, Thoresen, Steinsholm, Carlehög, & Kousoulaki, 2021; Steinsholm et al., 2020). Esto debido principalmente a que la grasa del pescado está compuesta en su mayoría por ácidos grasos insaturados (Benjakul et al., 2014; Lassoued et al., 2015), como es el caso de las vísceras de trucha arcoíris, donde estos representa alrededor 70 % del total de los lípidos (Fiori et al., 2012), los cuales son más propensos a ocasionar una rancidez oxidativa. Por todo lo anterior, se decidió realizar la optimización del modelo (ecuación 4.3) restringiendo la concentración de grasa a su valor mínimo ($G = 5,09\%$), encontrándose así que el valor de velocidad de agitación (v) que maximiza el grado de hidrólisis es de 102,10 rpm. Con un valor predicho para GH de 18,54%, no obstante, el valor obtenido para el GH a partir del promedio de tres ensayos experimentales fue de $20,48 \pm 1,07\%$ (Figura 4.6), alcanzando un error relativo de 9,38%.

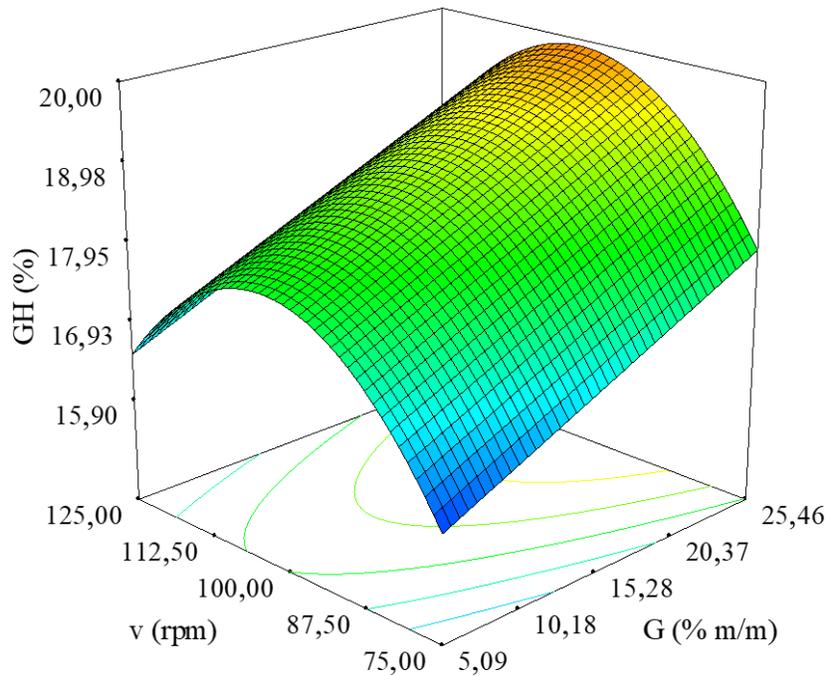


Figura 4.5. Superficie de respuesta para GH en función de la concentración de grasa y velocidad de agitación, ($S = 5,45\%$, $e = 0,72$ UA/g, $T = 60$ °C y $pH = 8,5$).

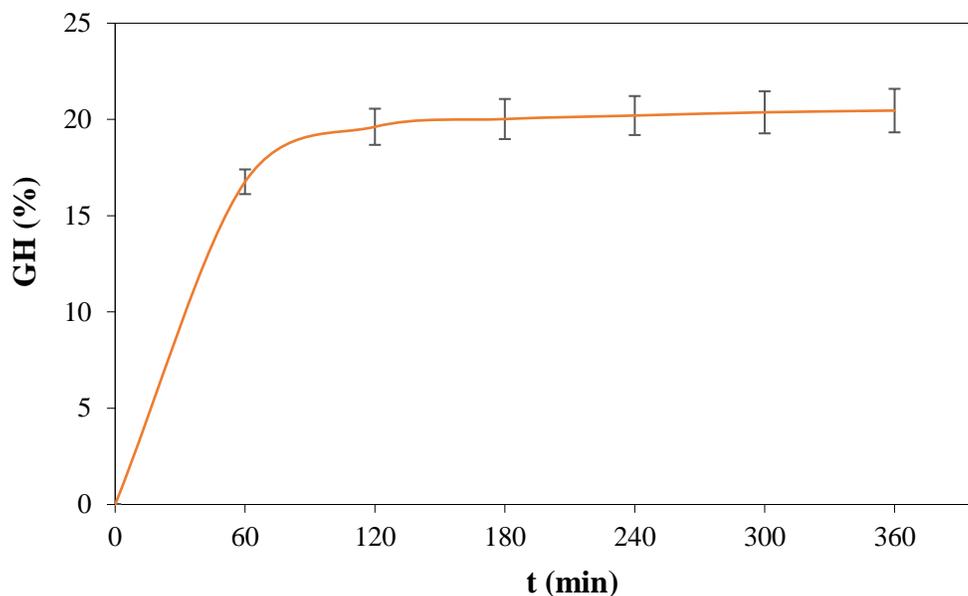


Figura 4.6. Grado de hidrólisis (GH) vs tiempo de reacción (t). $S = 5,45\%$, $e = 0,72$ UA/g, $T = 60^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 8,5$, $G = 5,09\%$ y $v = 102$ rpm. (I) desviaciones estándar.

4.3. Caracterización de los hidrolizados enzimáticos de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Una vez obtenidas las condiciones de operación óptimas: concentración de sustrato (5,45% m/v), concentración de enzima (0,72 UA/g de proteína), concentración de grasa (5,09% m/m) y velocidad de agitación 102 rpm, a una temperatura de 60 °C y un pH de 8,5 con las cuales se maximiza el GH ($20,48 \pm 1,07\%$) después de 6 horas de reacción de las proteínas de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa® 2.4L. Se procedió a caracterizar dicho los hidrolizados con respecto a su composición proximal, contenido de metales pesados, calidad microbiológica, composición polipeptídica y de aminoácidos, para posteriormente evaluar sus propiedades bioactivas y funcionales.

4.3.1. Composición proximal

Los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L (HT), fueron sometidos a procesos de liofilización para facilitar su almacenamiento y posterior uso, presentando un porcentaje de humedad de $5,83 \pm 0,42\%$. El contenido de proteína fue de

63,18 ± 1,66% (base húmeda), siendo ligeramente inferior a los valores reportados sobre hidrolizados de subproducto de pescado, los cuales oscilan entre 64% al 88% de proteína (Alvares, Conte-Junior, Pierucci, de Oliveira, & Cordeiro, 2018; Morales-Medina, Pérez-Gálvez, Guadix, & Guadix, 2016; Slizyte et al., 2016; Wald et al., 2016; Yi et al., 2016). Sin embargo, la composición proximal de los hidrolizados va a depender en gran medida de la composición de la materia prima, las características de la enzima, las condiciones de concentración y de proceso utilizadas (Opheim et al., 2015). Por su parte, el contenido de lípidos fue de 4,98 ± 0,15%, valor similar al encontrado para VT (Tabla 4.1); no obstante, se observa un aumento de 1,8 veces en el valor de contenido de cenizas de HT (6,81 ± 0,14%), con respecto al valor reportado para VT (Tabla 4.1), lo cual puede deberse principalmente a la cantidad de NaOH adicionado para mantener constante el pH en el proceso de hidrólisis. Sin embargo, tanto el contenido de lípidos como el de ceniza se encuentran dentro de los rangos reportados para otros hidrolizados de vísceras de pescados (Villamil et al., 2017).

4.3.2. Calidad microbiológica

Se evaluó la calidad microbiológica de los hidrolizados enzimáticos de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L (Tabla 4.10). En los resultados se puede observar que existe una disminución en los recuentos de bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales, mohos y levaduras, en comparación con los recuentos obtenidos para VT (Tabla 4.3). Esto puede deberse principalmente a los procesos de calentamiento ocurridos en la hidrólisis enzimática, además de las condiciones de pH alcalino a las cuales se realiza la reacción (Figura 3.2). Asimismo, se observa que los resultados encontrados sobre microorganismos patógenos (*E. coli*, *Salmonella sp* y *Vibrio cholerae*) son inferiores a los límites máximos permitidos por la reglamentación colombiana (NTC-5443, 2015) para productos provenientes de la acuicultura, indicando esto que HT es seguro caso de ser utilizado en formulaciones de alimentos, en cuanto a su calidad microbiológica.

Tabla 4.10. Calidad microbiológica de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris

Microorganismo	HT*	Patrón Microbiológico**
Bacterias Aerobias Mesófilas	< 100 UFC/mL	N/E
Coliformes totales	< 3 NMP /100mL	N/E
<i>Escherichia coli</i>	< 3 NMP/100mL	m = 10 M = 400 (n = 5, c = 2)
<i>Salmonella sp.</i>	Ausencia/25g	Ausencia/25g
<i>Vibrio cholerae</i>	Ausencia/25g	Ausencia/25g
Mohos y Levaduras	2,9 x 10 ² UFC/mL	N/E

* HT utilizado en la determinación, se obtuvo en las condiciones óptimas de hidrólisis.

** De acuerdo con NTC 5445 de 2015.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias, NMP: Número más probable de bacterias.

N/E: no establecido.

4.3.3. Contenido de metales pesados

Se determinó el contenido de metales pesados (Hg, Pb, Cd y As) en los hidrolizados enzimáticos de vísceras de trucha arcoíris y sus resultados se presentan en la Tabla 4.11. En estos se puede observar que HT presenta niveles de metales pesados inferiores a los límites máximos establecidos por la Unión Europea (Reglamento-582, 2016) y por la normatividad colombiana vigente (NTC-5443, 2015), haciéndolo un producto seguro en el caso de ser utilizado en formulaciones de alimentos. Si bien, este tipo de análisis son de gran importancia en países como Colombia, son escasas las investigaciones publicadas en hidrolizados de subproductos de pescado. No obstante, Tkaczewska, Jamroz, Kulawik, Morawska, & Szczurowska (2019), encontraron que para los hidrolizados de piel de carpa (*Cyprinus carpio*) con Protamex, los niveles de mercurio y de plomo fueron de 0,024 y 0,177 mg/kg, respectivamente; los cuales son superiores a los encontrados en HT.

Tabla 4.11. Contenido de metales pesados en hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris

Parámetro	Concentración (mg/kg)	Límite máximo permitido (mg/kg)**
Hg	0,008 ± 0,001	0,50
As	< LD	N/E
Pb	0,165 ± 0,014	0,30
Cd	< LD	0,05

** De acuerdo con el Reglamento 582/2016 de la Comisión de la Unión Europea
LD: Límite de detección (As < 0,200 mg/kg; Cd < 0,08 mg/kg).
N/E: no establecido.

4.3.4. Composición de aminoácidos

El perfil de aminoácidos de las vísceras de trucha arcoíris procesadas (VT) y de sus hidrolizados enzimáticos con Alcalasa® 2.4L (HT) se muestra en la Tabla 4.12. En los resultados de la composición de aminoácidos se observa que ambas muestras presentan perfiles muy similares, presentado una concentración total de aminoácidos para HT de 48,58 g/ 100 g de proteína y para VT de 47,20 g/ 100 g proteína. Igualmente, el aminoácido predominante es el Glu/Gln, el cual se encuentra a una concentración de 7,06 g/ 100 g proteína en HT y de 6,57 g/ 100 g proteína en VT, representando un porcentaje con respecto al total de aminoácidos del 14,53% y 13,93%, respectivamente, seguido por los aminoácidos Asp/Asn y Gly. Estos resultados concuerdan con los reportados por Nikoo, Benjakul, Yasemi, Ahmadi Gavlighi, & Xu (2019) para hidrolizados de subproductos (cabeza, vísceras, aletas y esqueleto) de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) donde los aminoácidos mayoritarios fueron ácido glutámico/glutamina (3,47 g/ 100 g proteína) y ácido aspártico/asparagina (2,92 g/ 100 g proteína). De igual manera, los estudios realizados por Suwal, Ketnawa, Liceaga, & Huang (2018) en hidrolizados de esqueleto de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y Tejpal et al. (2017) en hidrolizado de subproductos (cabeza, piel, aletas, esqueleto y víscera) de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), encontraron que los principales aminoácidos presentes fueron glicina, ácido aspártico y glutámico. Estos dos últimos aminoácidos (Glu y Asp) poseen altos efectos antioxidantes debido a la presencia de

electrones en exceso que pueden ser donados durante la interacción con los radicales libres (R. He, Girgih, Malomo, Ju, & Aluko, 2013).

Tabla 4.12. Composición de aminoácidos de las vísceras de trucha arcoíris (VT) y los hidrolizados enzimáticos (HT)

	Aminoácido	Concentración (g/100 g proteína)	
		VT	HT*
AAE	Leucina	3,600	3,630
	Histidina	1,470	1,559
	Isoleucina	2,049	1,962
	Lisina	3,456	3,678
	Valina	2,513	2,613
	Metionina	0,943	0,549
	Treonina	2,156	2,182
	Fenilalanina	2,180	2,340
	Triptófano	0,000	0,000
N-AAE	Arginina	3,308	3,401
	Tirosina	1,950	1,888
	Glicina	3,649	3,966
	Ácido Glutámico/Glutamina	6,574	7,057
	Serina	2,946	3,175
	Ácido Aspártico/Asparagina	4,250	4,380
	Cisteína	0,783	0,913
	Alanina	2,828	3,066
	Ácido Cisteico	0,154	0,126
	Prolina	2,388	2,093
AAE		18,365	18,513
N-AAE		28,830	30,064
Total		47,195	48,577
Aminoácidos hidrofóbicos (%)		40,751	39,226

* HT utilizado en la determinación, se obtuvo en las condiciones óptimas de hidrólisis.
AAE: Aminoácidos esenciales. N-AAE: Aminoácidos no esenciales
Aminoácidos hidrofóbicos: Ile, Leu, Met, Phe, Val, Ala, Pro y Cys.

El porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos (Ile, Leu, Met, Phe, Val, Ala, Pro y Cys) para VT y HT estuvo alrededor del 40% del total de aminoácidos. Estos son de gran importancia, debido a que las bioactividades de los hidrolizados de proteínas, más específicamente las actividades antioxidantes e inhibidora de la ECA se han relacionado positivamente con el alto contenido de estos aminoácidos (Gianfranceschi et al., 2018; Mada et al., 2019; L. Zhang et al., 2019). El porcentaje obtenido fue mayor al reportado por Wald et al. (2016) para hidrolizado de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), el cual fue del 22,7%. Sin embargo, las diferencias que pueden existir en dichos porcentajes, y por ende en su composición de aminoácidos, es debido a que estos van a depender tanto de las condiciones utilizadas para la hidrólisis, como de la enzima y sustrato (subproducto) empleados (Chalamaiah et al., 2012; Villamil et al., 2017).

4.3.5. Composición polipeptídica

Para determinar la composición polipeptídica de las vísceras de truchas arcoíris (VT) y sus hidrolizados enzimáticos óptimos (HT), se utilizaron los métodos de electroforesis (SDS-PAGE) y cromatografía de exclusión molecular (FPLC) utilizando dos columnas de diferente rango de separación. En la Figura 4.7 se presentan los perfiles electroforéticos de las proteínas de las vísceras de trucha arcoíris (VT) y sus hidrolizados enzimáticos (HT) en un gel de poliacrilamida al 15%. En los perfiles para VT, se observan de forma tenue las bandas típicas de miosina, proteína presente en el tejido visceral del pescado (Khan et al., 2020; Kristinsson & Rasco, 2000a). La banda presente alrededor de 250 kDa podría representar la miosina de cadena pesada (MCP) y el cumulo de bandas entre los 15 y 20 kDa podrían representar la miosina de cadena ligera (MCL). También se observan dos bandas, una de las cuales se encuentra alrededor de los 150 kDa y la otra a 37 kDa, las cuales podrían estar dadas por las proteínas miomesina y tropomiosina, respectivamente. Sin embargo, debido a la diversidad de órganos y tejidos (músculo liso y cardiaco, tejido conjuntivo) que componen las vísceras, se pueden presentar otros tipos de proteínas, como colágeno tipo III, elastina, glucoproteínas, calmodulina y enzimas (Gabella, 2002; Gehring et al., 2009; Khan et al., 2020), de las cuales no se puede garantizar que todas entraron en el gel o que incluso sean solubles en el buffer de carga, por lo que no se detectan adecuadamente con esta técnica. Por su parte, en la

muestra HT, no se detectaron bandas, lo que indica que los polipéptidos presentes estaban en muy baja concentración, por lo cual no se detectan adecuadamente mediante esta técnica o que el proceso de hidrólisis generó péptidos con pesos moleculares inferiores al límite de detección del gel (10 kDa).

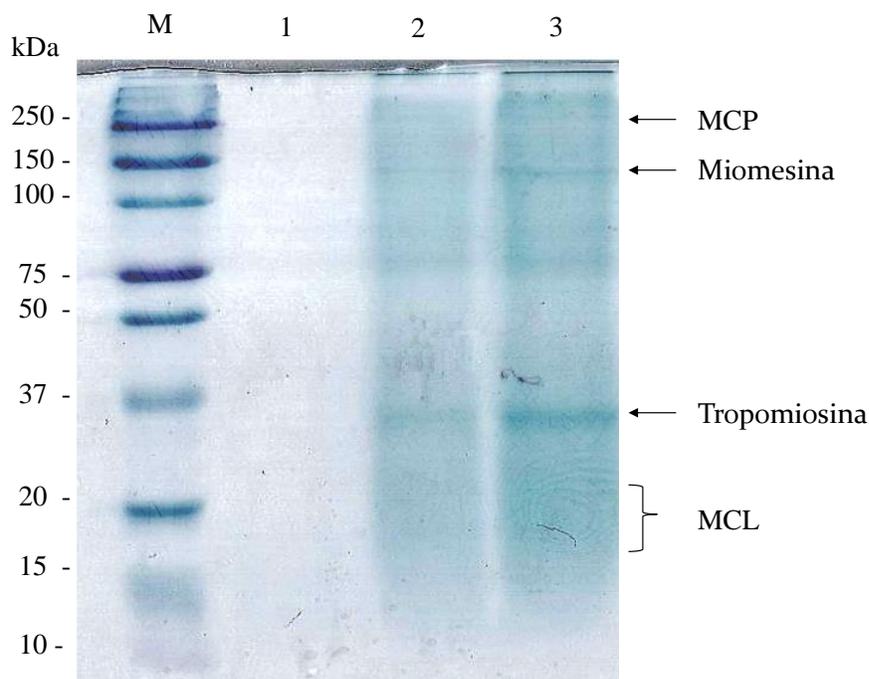


Figura 4.7. Electroforesis SDS-PAGE. 1). HT 8 mg/mL; 2). VT 4 mg/mL; 3). VT 8 mg/mL; M). Marcador de pesos moleculares.

Las poblaciones polipeptídicas de VT y HT se describen en términos de los perfiles cromatográficos (Filtración en gel - FPLC), las cuales se muestran en las Figuras 4.8 y 4.9. Una comparación entre los perfiles cromatográficos obtenidos usando la columna Superdex 75 (Figura 4.8) muestra una similitud entre ellos, presentando cinco fracciones en ambas muestras, donde su rango de pesos moleculares se presenta en la Tabla 4.13. En los perfiles se puede observar que la hidrólisis con Alcalasa® 2.4L generó una disminución en los polipéptidos minoritarios presentes entre 60,6kDa y 13,0kDa, y un aumento en especies moleculares menores de 6,5kDa; comportamiento que era de esperarse, ya que la hidrólisis enzimática disminuye el peso molecular de las proteínas y polipéptidos, liberando péptidos

de menor peso molecular con tamaños que varían entre 0,4 a 10 kDa (Abejón et al., 2018; Benjakul et al., 2014).

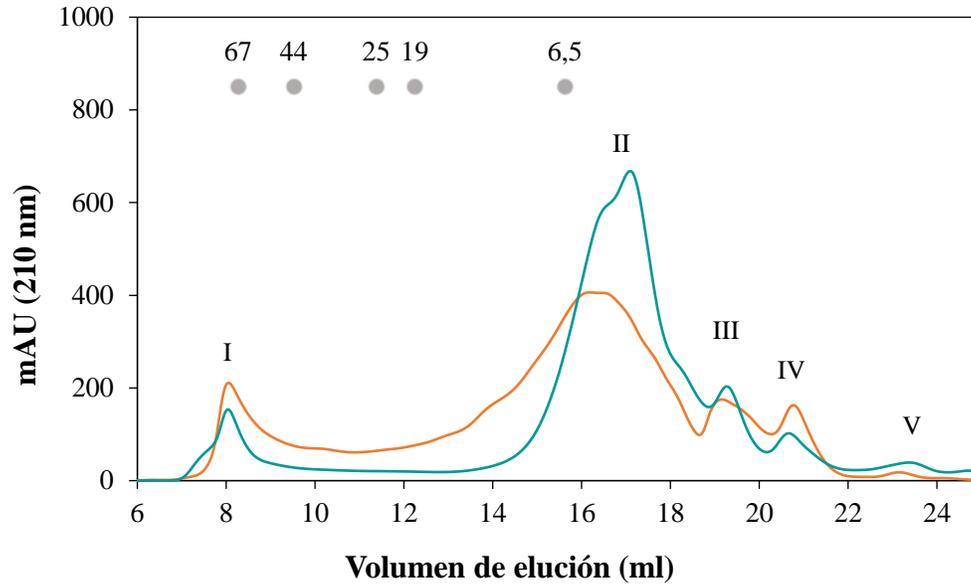


Figura 4.8. Perfiles cromatográficos de VT (—) y HT (—) en la columna Superdex 75 10/300 GL. (•) Peso molecular de los marcadores en kDa.

Tabla 4.13. Rango de pesos moleculares (MW) correspondientes a los picos presentes en los cromatogramas de la Figura 4.8.

Fracción	VT		HT	
	Volumen de elución (mL)	MW (kDa)	Volumen de elución (mL)	MW (kDa)
I	6,9 - 9,6	> 44,2	6,8 - 8,8	> 56,1
II	13,3 - 18,7	13,5 - 2,4	14,6 - 18,9	8,9 - 2,3
III	18,8 - 20,3	2,4 - 1,5	18,9 - 20,3	2,4 - 1,5
IV	20,4 - 22,0	1,4 - 0,9	20,3 - 21,5	1,5 - 1,0
V	22,8 - 23,7	0,7 - 0,5	22,8 - 23,8	0,7 - 0,5

Asimismo, los perfiles cromatográficos de las muestras analizadas en la columna de Superdex Peptide (Figura 4.9) presenta cuatro picos para VT y cinco para HT, donde los correspondientes rangos de peso molecular se presentan en la Tabla 4.14. En los perfiles obtenidos se puede observar que la reacción hidrólisis enzimática genera un aumento en el

número de péptidos menores de 6,5 kDa, comportamiento observado en la columna anterior. Además, se observa que HT presenta la mayor concentración de péptidos entre los 0,5 a los 7,7 kDa (pico II), lo cual sugiere que los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris son una opción prometedora para usos nutricionales y farmacéuticos, ya que varios estudios han demostrado que péptidos con pesos moleculares entre 1 a 4 kDa presentan diversas propiedades bioactivas, como antioxidante (Girgih et al., 2015; Gómez, Gómez, Zapata, et al., 2019; L. Zhang et al., 2019) e inhibidora de la ECA (Nasir & Sarbon, 2019; Ngo et al., 2016; Thuanthong et al., 2017).

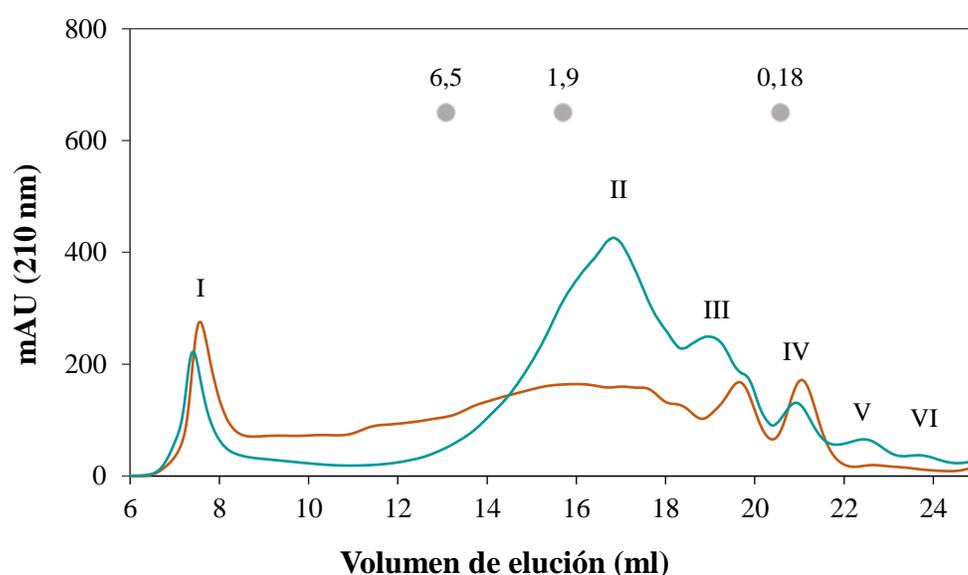


Figura 4.9. Perfiles cromatográficos de VT (—) y HT (—) en la columna Superdex peptide 10/300 GL. (•) Peso molecular de los marcadores en kDa.

Tabla 4.14. Rango de pesos moleculares (MW) correspondientes a los picos presentes en los cromatogramas de la Figura 4.9.

Fracción	VT		HT	
	Volumen de elución (mL)	MW (kDa)	Volumen de elución (mL)	MW (kDa)
I	6,6 - 8,6	> 10	6,6 - 8,6	> 10
II	10,9 - 18,1	> 10 - 0,5	12,3 - 18,4	7,7 - 0,5
III	18,1 - 18,9	0,5 - 0,4	18,4 - 20,7	0,5 - 0,2
IV	18,9 - 20,3	0,4 - 0,2	20,7 - 22,0	0,2 - 0,1
V			22,0 - 23,4	< 0,1

4.4. Modelado cinético de la hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Para el modelado de la hidrólisis enzimática de las vísceras de trucha arcoíris, se comenzó con la determinación de los parámetros cinéticos (V_{max} , K_m , k_2 , K_S y K_P) de manera experimental, en función del tipo de inhibición evaluada. Posteriormente, las curvas obtenidas para GH en función del tiempo a diferentes concentraciones iniciales de sustrato (S_0) y enzima (e_0), se ajustaron al modelo general establecido en la ecuación 3.8 de la sección 3.5., donde se determinó los parámetros a y b, con los cuales se halló la constante de inactivación térmica (k_d) para cada uno de los mecanismos. Para finalmente, reemplazar dichas constantes cinéticas encontradas en las expresiones establecidas en la Tabla 3.7 para los parámetros a y b en función de cada uno de los mecanismos de reacción y así establecer de manera más exacta cual es el mecanismo cinético que sigue la hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L.

4.4.1. Determinación de parámetros cinéticos

Para deducir experimentalmente los parámetros cinéticos tanto para el mecanismo sin inhibición (V_{max} y K_m), como para el mecanismo con inhibición acompetitiva por sustrato (V_{max} , K_m y K_S) se empleó la curva de saturación (Figura 4.10), la cual corresponde a las velocidades iniciales (v_0) halladas a partir de diferentes reacciones de hidrólisis enzimáticas, en las cuales se varió la concentración inicial de sustrato (S_0) y permanecieron constantes la concentración inicial de enzima (0,62 mM = 0,72 UA/g), temperatura (60 °C) y pH (8,5). Esta curva muestra un rasgo característico de las reacciones enzimáticas que siguen la cinética de Michaelis-Menten, es decir, la saturación de la enzima por el sustrato (Copeland, 2013). Asimismo, se puede observar que, a bajas concentraciones de sustrato, la velocidad inicial de la reacción es directamente proporcional a dicha concentración, esto debido a que la concentración del complejo ES sería directamente proporcional a la concentración de sustrato y por lo tanto, la reacción enzimática sería de primer orden (Marangoni, 2002). No obstante, a valores más altos de concentración de sustrato ($S_0 > 550$ mM), la velocidad de reacción es independiente de dicha concentración y prácticamente toda la enzima estaría

presente en forma del complejo ES, por lo que la velocidad va a depender únicamente de la velocidad de las transformaciones químicas que convierten el complejo ES en EP y la posterior liberación del producto para volver a formar la enzima libre, de ahí que la pendiente de la gráfica de v_0 versus S_0 se acercaría a cero (Copeland, 2013). En la Tabla 4.15 se muestran los valores de las constantes cinéticas, las cuales se hallaron a partir del ajuste de los datos experimentales (Figura 4.11) a la ecuación 3.9 (Michaelis-Menten) y 3.11 (inhibición por sustrato); además de los parámetros estadísticos que determinan la bondad de ajuste para cada modelo. En este caso, el mecanismo de inhibición por sustrato presentó un mejor ajuste con los datos experimentales, debido a que obtuvo un coeficiente de determinación ajustado levemente mayor ($R_{\text{adj}}^2 = 0,997$) que el obtenido con el modelo sin inhibición.

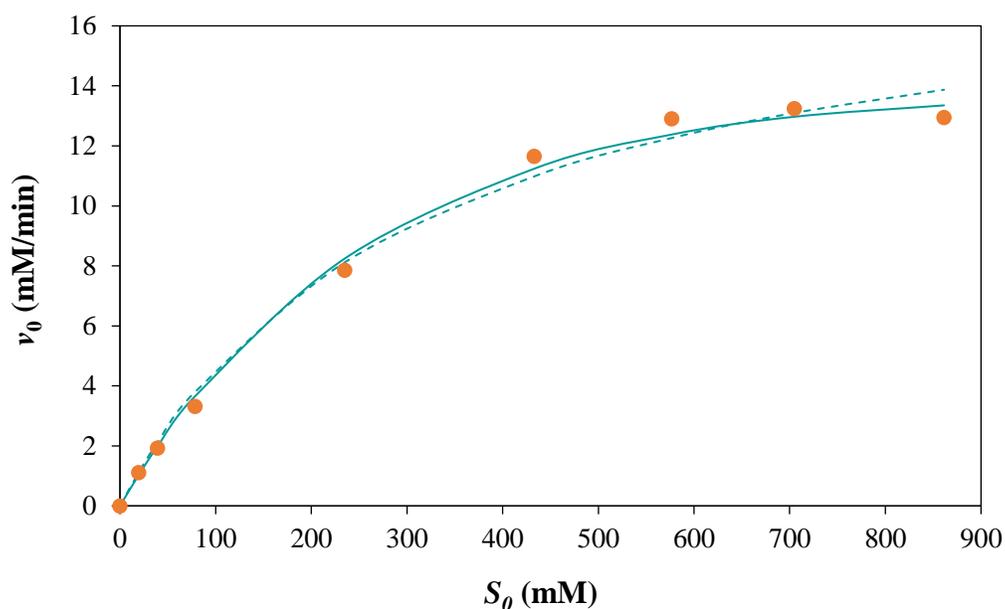


Figura 4.10. Curva de saturación de la hidrólisis de vísceras de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa® 2.4L. Datos experimentales (•), modelo sin inhibición (---), inhibición acompetitiva por sustrato (—).

Asimismo, para evaluar el tipo de inhibición que puede ejercer los productos de la hidrólisis sobre la reacción enzimática, se elaboró las gráficas del doble recíproco (Lineweaver-Burk) para los diferentes niveles de producto (0%, 5% y 10%) (Figura 4.11). En esta se puede observar que las líneas rectas tienen una intersección común cercana al eje “y”, similar a las gráficas de inhibición del tipo competitiva, sin embargo, según la literatura

para que se cumpla este tipo de inhibición, las líneas deben converger exactamente sobre el eje “y” (Copeland, 2013; Illanes et al., 2008). Es por esto, que para determinar de manera más precisa el tipo de inhibición ejercida por los productos de la hidrólisis, se ajustaron globalmente las gráficas de v_0 vs S_0 a las ecuaciones 3.12, 3.13 y 3.14, a la vez que se determinó la velocidad de reacción máxima aparente ($V_{max,ap}$), la constante de Michaelis-Menten aparente ($K_{m,ap}$), la constante de inhibición por producto (K_P), los cuales se muestran en la Tabla 4.15. Según el análisis de los parámetros para la bondad del ajuste, se encontró que efectivamente el tipo de inhibición ejercida por los productos es del tipo competitiva, ya que se obtuvo el error medio cuadrático más bajo ($RMSE = 2,65 \times 10^{-3}$) y el R_{adj}^2 más alto (0,995) en comparación con los otros tipos de inhibición por producto evaluados.

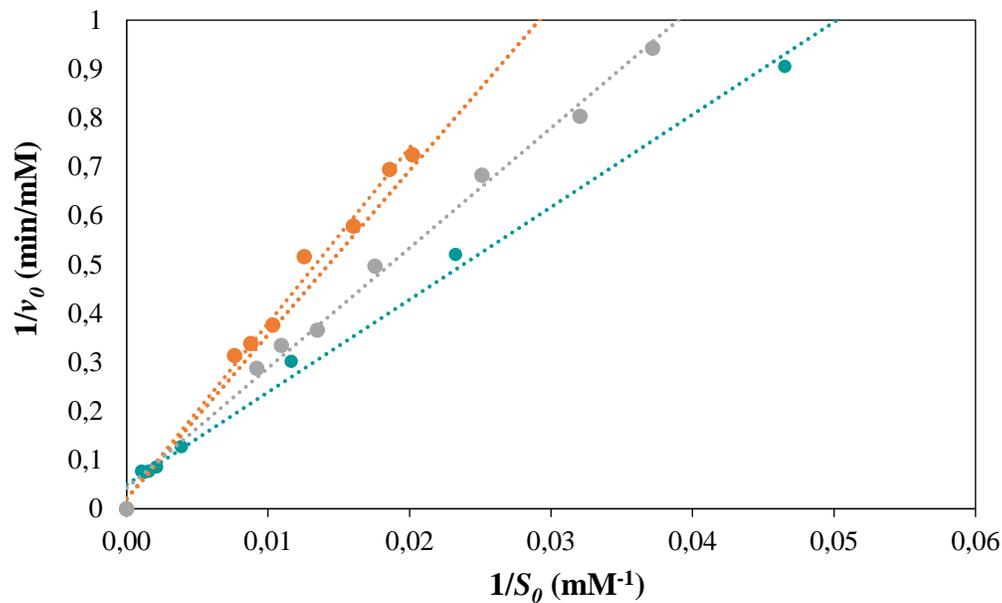


Figura 4.11. Gráficos de Lineweaver-Burk para la hidrólisis de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa® 2.4L con diferentes concentraciones de producto, 0% (•), 5% (•) y 10% (•).

Analizando los valores obtenidos para K_m y V_{max} , los cuales oscilan entre 311,90 mM a 456,89 mM y 18,89 a 25,06 mM/min respectivamente, se observa que son más altos a los reportados para las cinéticas enzimáticas de proteínas de pescado, como por ejemplo los obtenidos por Gómez et al. (2019) para la hidrólisis enzimática de vísceras de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) con Alcalasa® 2.4L, los cuales alcanzaron un K_m de 54,98 mM y una V_{max}

de 2,16 mM/min (0,036 mM/s). Por su parte, Valencia et al. (2014) reportaron valores de 9,54 mM y 2,14 mM/min para K_m y V_{max} en el estudio de la cinética enzimática de músculo de salmón (*Salmo salar*) con Alcalasa® 2.4L a 60 °C. No obstante, obtener altos valores para V_{max} significa que la enzima, en este caso la Alcalasa® 2.4L convirtió más cantidad de la proteína presente en las vísceras de trucha arcoíris en producto por unidad de tiempo cuando la enzima estaba saturada con sustrato. Asimismo, un alto valor de K_m significa que la enzima necesita una mayor concentración de sustrato para que la enzima se sature, debido a que presenta menor afinidad hacia el sustrato en la reacción enzimática (Charoenphun, Youravong, & Cheirsilp, 2013; Ghassem et al., 2011). Una vez obtenidos los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) para cada uno de los mecanismos, se determinó por medio de la ecuación 2.5 (capítulo 2) el valor de la constante de velocidad catalítica (k_2), como se muestra en la Tabla 4.15.

Tabla 4.15. Constantes cinéticas para los diferentes mecanismos evaluados

Constantes cinéticas	Sin Inhibición	Inhibición por Sustrato	Inhibición por Producto		
			Competitiva	No competitiva	Acompetitiva
K_m (mM)	311,90	456,89	365,60	345,70	401,23
V_{max} (mM/min)	18,89	25,06	23,38	15,22	15,86
k_2 (min ⁻¹)	30,62	40,60	37,89	24,66	25,69
k_d (min ⁻¹)	7,13	12,55	10,93	4,64	5,03
k_3 (mM ⁻¹ .min ⁻¹)	0,023	0,027	0,030	0,013	0,012
K_S (mM)	---	2487,03	---	---	---
K_P (mM)	---	---	40,97	199,80	50,00
α	---	---	---	15	9,99
R^2	0,992	0,998	0,996	0,957	0,951
R_{adj}^2	0,991	0,997	0,995	0,932	0,935
SSE*	5,73 x 10 ⁻⁴	2,62 x 10 ⁻⁴	3,53 x 10 ⁻⁵	7,14 x 10 ⁻⁴	8,21 x 10 ⁻⁴
RSME**	9,05 x 10 ⁻³	6,61 x 10 ⁻³	2,65 x 10 ⁻³	0,012	0,011

* SSE: suma de errores cuadrados.

** RMSE: error medio cuadrático.

Habiendo calculado la constante de velocidad catalítica k_2 para cada uno de los mecanismos, se continuo con la determinación de la constante de inactivación térmica (k_d), a partir de la ecuación 3.15, la cual utiliza la relación de los parámetros cinéticos a y b . Por

este motivo, para determinar dichos parámetros se realizaron dos conjuntos de reacciones enzimáticas de las proteínas de las vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L a una temperatura de 60 °C y un pH de 8,5; donde en el primer conjunto de hidrólisis se varió las concentraciones iniciales de sustrato (S_0) y se mantuvo constante la concentración inicial de enzima e_0 (0,62 mM = 0,72 UA/g) como se muestra en la Figura 4.12. Por su parte, en el segundo conjunto de experimentos se varió la concentración inicial de enzima (e_0) y se mantuvo constante S_0 (433 mM = 5,50% m/v), como se presenta en la Figura 4.13. Así, los valores de los parámetros cinéticos a y b se determinaron ajustando la ecuación logarítmica (ecuación 3.8), y se presentan en la Tabla 4.16.

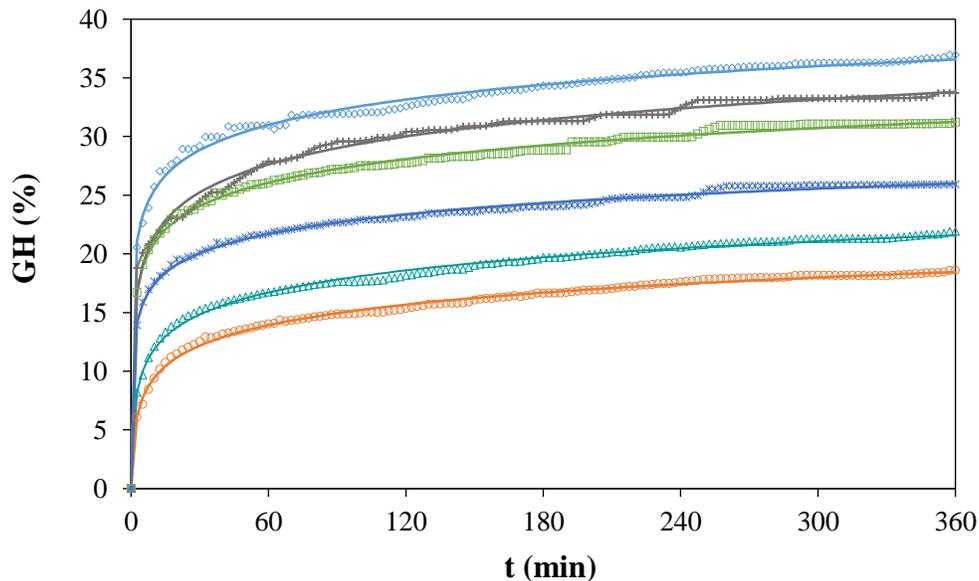


Figura 4.12. GH vs t a diferentes S_0 : 20 mM (\diamond); 39 mM (+); 78 mM (\square); 235 mM (\times); 433 mM (Δ); 861 mM (\circ) con $e_0 = 0,62$ mM, $T = 60^\circ\text{C}$ y $\text{pH} = 8,5$. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas los valores predichos por el modelo ajustado ecuación 3.8).

En la Figura 4.12, se puede observar que la velocidad de reacción inicial $[d(\text{GH})/dt]$ permaneció aproximadamente igual entre las diferentes concentraciones iniciales de sustrato, no obstante, a medida que dicha concentración aumentaba, se disminuía el GH; comportamiento que también se observa en los valores del parámetro a , los cuales disminuyen con el aumento de la concentración de sustrato. Lo anterior puede deberse a que

existe una inhibición acompetitiva por el sustrato, como lo indican los autores Zapata et al. (2018) y Valencia et al. (2019). Por otro lado, se observa en la Figura 4.13 que la concentración inicial de enzima afecta la velocidad de reacción inicial, ya que a mayor e_0 , aumenta la pendiente inicial del curso del tiempo de reacción, además de generar un aumento en el GH, alcanzando en este caso valores cercanos al 25%. Una vez conocidos los parámetros cinéticos a y b , y sabiendo que independientemente del mecanismo a evaluar, la relación a/b da como resultado la misma expresión, establecida en la ecuación 3.15, con la cual es posible obtener una línea recta, como se muestra en la Figura 4.14, y así determinar la pendiente, que representa la expresión $(k_2)^2/k_d$ que permite determinar la constante k_d para cada uno de los mecanismos como se muestra en la Tabla 4.15.

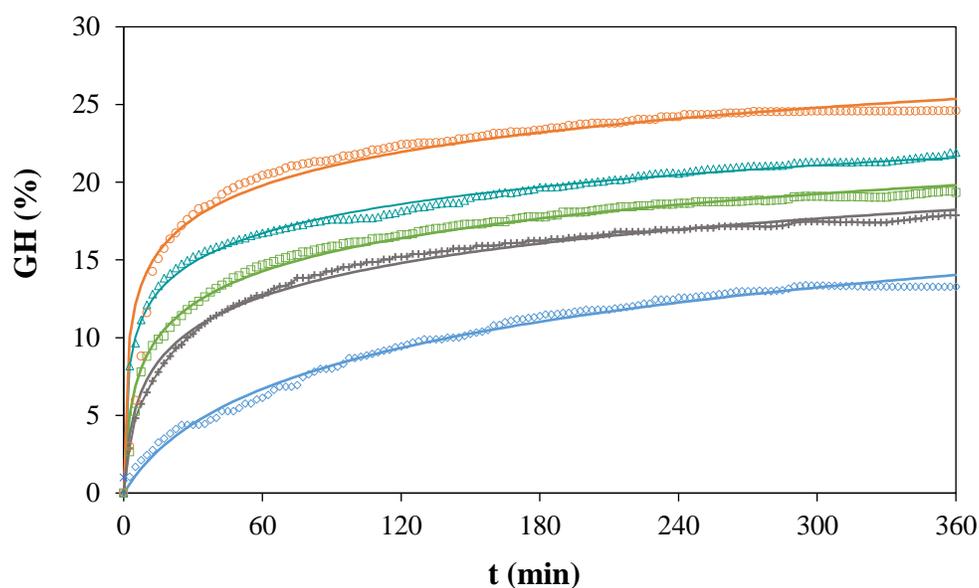


Figura 4.13. GH vs t a diferentes e_0 : 0,02 mM (\diamond); 0,21 mM (+); 0,41 mM (\square); 0,62 mM (\triangle); 1,02 mM (\circ) con $S_0 = 433$ mM, $T = 60$ °C y $pH = 8,5$. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas son los valores predichos por modelo ajustado (ecuación 3.8).

Tabla 4.16. Parámetros cinéticos a y b para la hidrólisis de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con diferentes concentraciones iniciales de sustrato y enzima a $T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH} = 8,5$.

S_0 (mM)	e_0 (mM)	a (min^{-1})	b	R_{adj}^2	RSME*
20	0,62	1,242	0,292	0,992	1,673
39	0,62	0,533	0,318	0,979	1,766
78	0,62	0,359	0,263	0,994	1,239
235	0,62	0,155	0,328	0,997	1,079
433	0,02	0,001	0,216	0,991	1,478
433	0,21	0,007	0,302	0,989	1,507
433	0,41	0,019	0,296	0,988	1,581
433	0,62	0,044	0,292	0,993	1,097
433	1,02	0,083	0,280	0,976	4,374
861	0,62	0,022	0,254	0,995	0,898

* RMSE: error medio cuadrático.

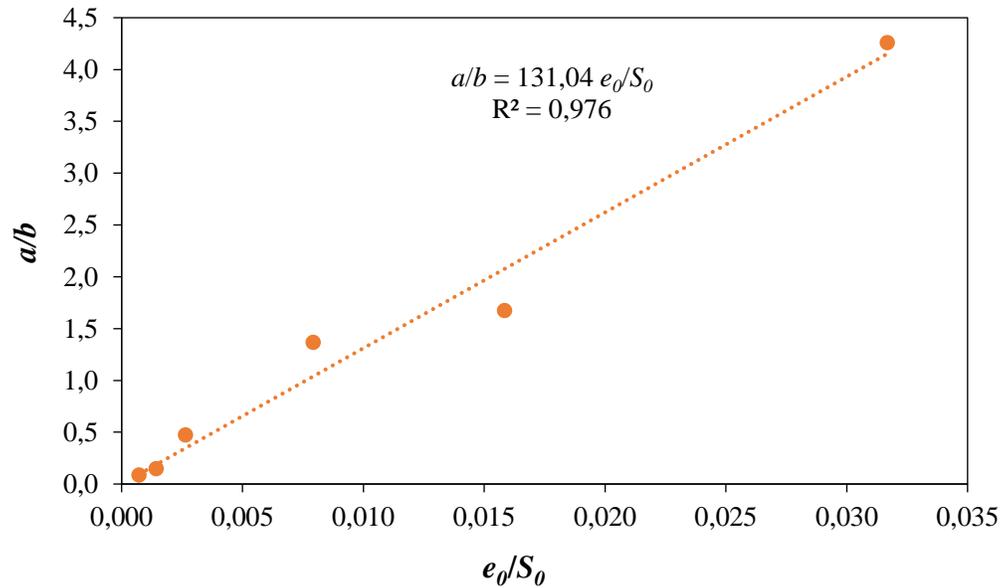


Figura 4.14. Relación a/b vs e_0/S_0 para la determinación de la constante cinética k_d .

4.4.2. Evaluación de modelos cinéticos

Determinadas todas las constantes cinéticas necesarias para evaluar el tipo de mecanismo que sigue la hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L, los valores fueron reemplazados para cada mecanismo en las expresiones establecidas para los parámetros a y b en la Tabla 3.7, y posteriormente en la ecuación 3.8. Obteniéndose así los modelos para el mecanismo sin inhibición (ecuación 4.4), inhibición por sustrato (ecuación 4.5), inhibición por producto (ecuación 4.6) e inhibición por sustrato y producto (ecuación 4.7), los cuales se muestran a continuación:

$$GH = 0,233 \ln \left(7,130 \frac{e_0}{S_0} t + 1 \right) \quad (4.4)$$

$$GH = \left(3,236 + 1,301 \times 10^{-3} S_0 \right) \ln \left[\frac{77,625 \times 10^6}{(2874,03 + S_0)^2} \frac{e_0}{S_0} t + 1 \right] \quad (4.5)$$

$$GH = \left(\frac{13,852 \times 10^3 + 1,552 \times 10^3 S_0}{447,802 S_0} \right) \ln \left[\frac{18,346 \times 10^3 S_0^2}{(365,60 + 40,970 S_0)^2} \frac{e_0}{S_0} t + 1 \right] \quad (4.6)$$

$$GH = \left(\frac{46,134 \times 10^6 + 4,137 \times 10^6 S_0 + 1,663 \times 10^3 S_0^2}{1,279 \times 10^6 S_0} \right) \ln \left[\frac{1,303 \times 10^{11} S_0^2}{(1,136 \times 10^6 + 0,102 \times 10^6 S_0 + 40,960 S_0^2)^2} \frac{e_0}{S_0} t + 1 \right] \quad (4.7)$$

Los resultados del ajuste de los modelos y los datos experimentales a diferentes concentraciones de sustrato se muestran en la Figura 4.15 para el mecanismo sin inhibición, Figura 4.16 para inhibición acompetitiva por sustrato, Figura 4.17 para inhibición competitiva por producto y Figura 4.18 para inhibición por sustrato y producto. En la Figura 4.15, se puede observar que a bajas concentraciones de sustrato ($S_0 \ll K_m$) con las concentraciones de sustrato evaluadas de 20 mM y 78 mM, la hidrólisis de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L sigue un mecanismo sin inhibición, obteniéndose una buena

correlación entre los valores experimentales y los predichos, como se evidencia en los parámetros estadísticos de bondad de ajuste, los cuales fueron para el error medio cuadrático (RSME) inferiores a 1,95 y para R_{adj}^2 alrededor del 0,99. Lo anterior puede deberse a que, en este rango de concentración, los sitios activos de la enzima nunca alcanzan la saturación, como se observa en la Figura 4.10 (Curva de saturación). Sin embargo, este comportamiento no se cumplió en las concentraciones más altas de sustrato ($S_0 > K_m$).

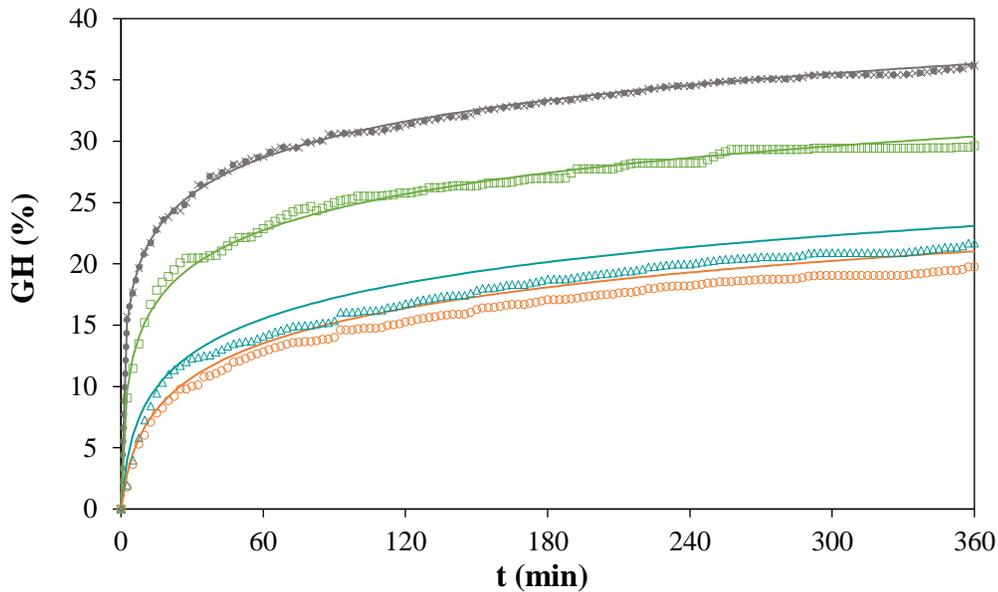


Figura 4.15. Curvas de GH vs t, usadas para la validación del modelo sin inhibición (ecuación 4.4), a diferentes S_0 : 20 mM (x); 78 mM (□); 433 mM (△); 861 mM (○) con $e_0 = 0,62$ mM, $T = 60$ °C y $pH = 8,5$. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas los valores predichos por el modelo.

No obstante, en la Figura 4.16, en la cual se muestra la verificación del mecanismo de inhibición por sustrato, se observa que a concentraciones de sustrato superiores a 433 mM la hidrólisis de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L sigue este tipo de mecanismo, corroborándose con los parámetros de bondad de ajuste obtenidos para las concentraciones de sustrato de 433 mM y 861 mM, los cuales proporcionaron valores inferiores a 1,96 para el error medio cuadrático (RSME) y R_{adj}^2 superiores al 0,98. Este comportamiento se ve soportado con la tendencia de los valores hallados para el parámetro cinético a , los cuales

decrecían a medida que aumentaba la concentración de sustrato, indicando una posible inhibición por sustrato. Este tipo de inhibición puede presentarse porque una segunda molécula de sustrato se une al complejo ES para formar un complejo ternario inactivo, SES. Debido a que la formación del complejo ES debe preceder a la formación del complejo ternario inhibitorio, la inhibición del sustrato generalmente se realiza solo a altas concentraciones de sustrato (Copeland, 2013). La inhibición por sustrato ha sido reportada por algunos autores en la hidrólisis enzimática de proteínas con alcalasa, como por ejemplo en víscera de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) (Zapata et al., 2018), plasma bovino (Figuroa et al., 2016) y caseína (Trusek-Holownia, 2008). Con respecto a los mecanismos de inhibición por producto e inhibición por sustrato y producto, se observó que la hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris no sigue estos tipos de cinética, debido a que no se encontró buena correlación entre los valores predichos y experimentales en las condiciones evaluadas.

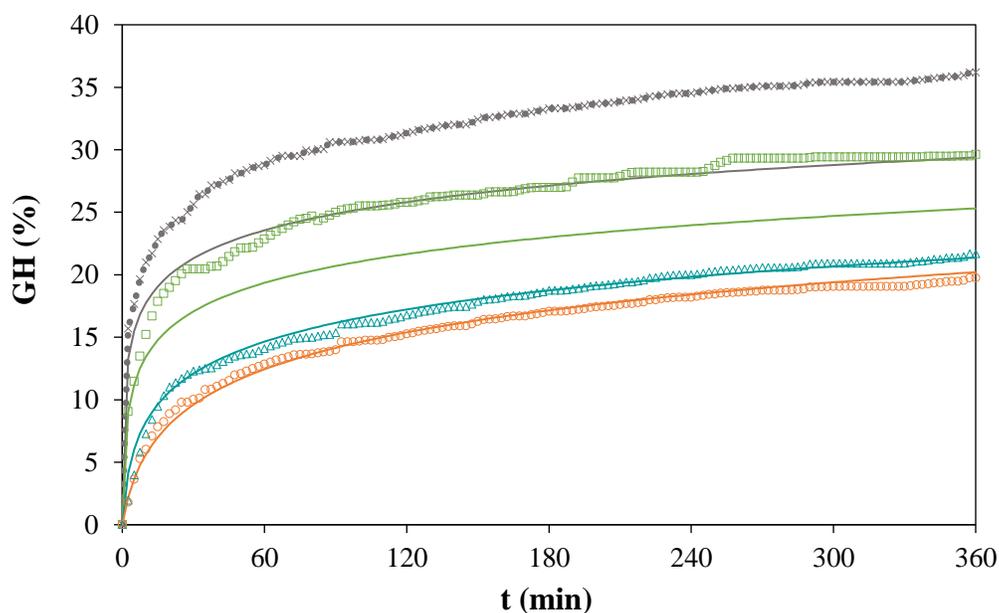


Figura 4.16. Curvas GH vs t , usadas para la validación del modelo de inhibición por sustrato (ecuación 4.5), a diferentes S_0 : 20 mM (\times); 78 mM (\square); 433 mM (\triangle); 861 mM (\circ) con $e_0 = 0,62$ mM, $T = 60$ °C y $pH = 8,5$. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas los valores predichos por el modelo ajustado.

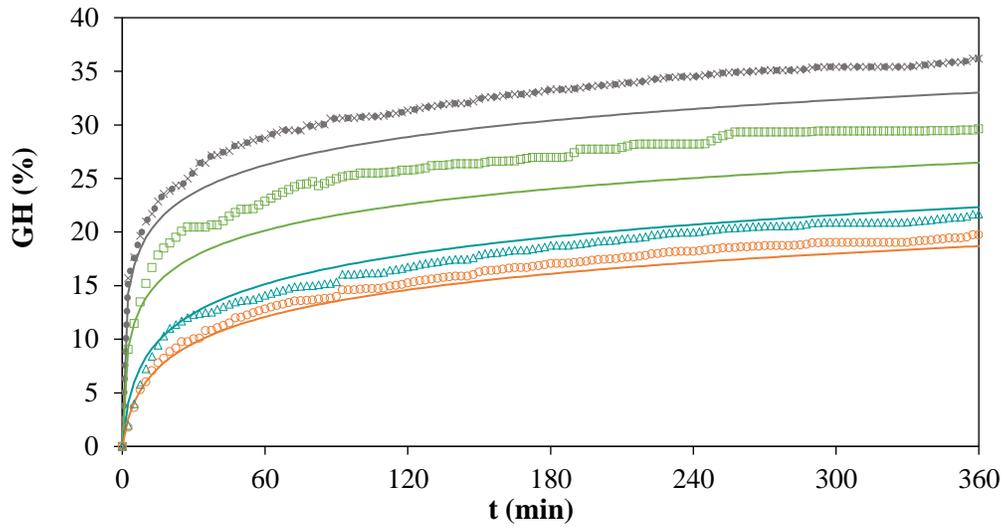


Figura 4.17. Curvas GH vs t usadas para la validación del modelo de inhibición por producto (ecuación 4.6), a diferentes S_0 : 20 mM (x); 78 mM (□); 433 mM (Δ); 861 mM (○) con $e_0 = 0,62$ mM, $T = 60$ °C y $pH = 8,5$. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas son los valores predichos por el modelo ajustado.

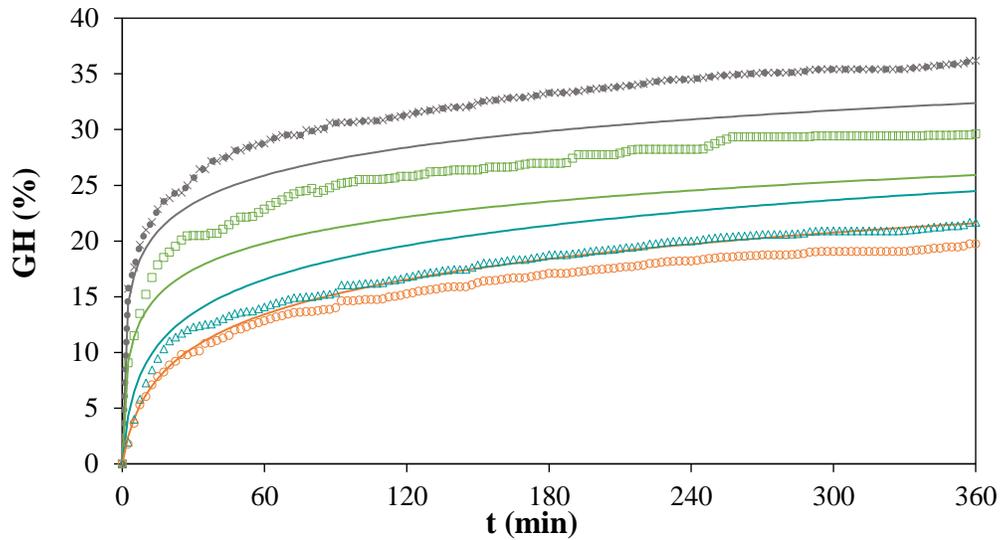


Figura 4.18. Curvas GH vs t, usadas para la validación del modelo de inhibición por sustrato y producto (ecuación 4.7), a diferentes S_0 : 20 mM (x); 78 mM (□); 433 mM (Δ); 861 mM (○) con $e_0 = 0,62$ mM, $T = 60$ °C y $pH = 8,5$. Los puntos representan los datos experimentales y las líneas continuas son los valores predichos por el modelo ajustado.

Estos resultados muestran que la hidrólisis de las proteínas de las vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L no sigue un único mecanismo de reacción, ya que esto va depender de las condiciones de operación, en este caso se observó más específicamente con la variación de la concentración de sustrato, uno de los factores más importantes que determinan la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas (Mariñas-Collado, Rivas-López, Rodríguez-Díaz, & Santos-Martín, 2019), el cual vario en un amplio rango, desde los 20 mM (0,25% m/v) hasta los 861 mM (11,0% m/v). Este tipo de comportamiento, en el que a bajas concentraciones de sustrato, la cinética sigue un comportamiento Michaelis-Menten simple, pero que por encima de una concentración crítica de sustrato, los datos se desvían significativamente del comportamiento esperado para la velocidad de reacción, ocurre con muchos tipos de enzimas con diferentes grupos de unión, cada uno combinado con una parte particular de la molécula del sustrato (Mariñas-Collado et al., 2019). Lo cual se debe a que en un complejo enzima-sustrato efectivo, una molécula de sustrato única se une con todos los diferentes grupos de la enzima en una posición particular. Sin embargo, podría suceder que algunos de los grupos de unión se combinen con una molécula de sustrato y el resto con una molécula de sustrato diferente (complejos ineficaces). En altas concentraciones de sustrato, donde las moléculas de sustrato tienden a agruparse alrededor de la enzima, aumentan las posibilidades de formación de complejos ineficaces, con dos o más moléculas de sustrato. En este caso, se observan desviaciones de la dependencia hiperbólica de la velocidad en la concentración del sustrato (Copeland, 2013; Leow & Chan, 2019; Mariñas-Collado et al., 2019).

4.5. Evaluación de la actividad antioxidante de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L (HT)

La capacidad antioxidante de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L (HT) se evaluó mediante cuatro métodos químicos *in vitro*, dos basados en reacciones de transferencia de átomos de hidrogeno (ORAC y HORAC), y los dos restantes basados en reacciones de transferencia de electrones (ABTS y FRAP), con el objetivo de abarcar algunos de los tipos de reacciones involucradas en los procesos oxidativos de los sistemas alimentarios o biológicos, y así caracterizar el potencial antioxidante de los hidrolizados. Inicialmente se evaluó la influencia del GH (0% - 20%) sobre la capacidad

antioxidante de HT y posteriormente, el impacto del peso molecular de los hidrolizados (> 100 kDa, 10 - 100 kDa, 3 - 10 kDa y < 3kDa) sobre dicha actividad.

4.5.1. Influencia del GH sobre la actividad antioxidante de los hidrolizados

Si bien los métodos empleados no pueden ser comparados entre sí, debido a que utilizan condiciones y mecanismos de reacción diferentes, en los resultados se puede observar (Figuras 4.19 a 4.22) un incremento en la actividad antioxidante con la hidrólisis enzimática en comparación a la proteína sin hidrolizar (GH 0%), además de una correlación positiva entre el GH y la actividad antioxidante, ya que a medida que aumenta el GH, la actividad antioxidante es mayor, obteniéndose en todos los casos una actividad antioxidante más alta al GH de 20% ($p < 0,05$). Esto se debe a que la hidrólisis enzimática altera las propiedades fisicoquímicas de la proteína nativa, como son su tamaño, forma, carga neta, distribución de cargas y la capacidad de reaccionar con otros componentes, en este caso con agentes oxidantes; lo cual también va a depender de la extensión de la hidrólisis, ya que a medida que la reacción avanza la proteína se divide gradualmente en unidades peptídicas más pequeñas y con mayor cantidad de grupos ionizables, mejorando su actividad biológica (Kristinsson & Rasco, 2000a; R. Liu, Xing, Fu, Zhou, & Zhang, 2016; Sila & Bougatef, 2016). Estos cambios causados por la hidrólisis enzimática en las proteínas de vísceras de trucha arcoíris se ven reflejados en los resultados obtenidos en la composición polipeptídica (Figura 4.8 y 4.9), donde se observó un aumento en la concentración de péptidos entre los 6,5 kDa a los 0,5 kDa, al comparar los perfiles de las proteínas hidrolizadas con respecto a las proteínas sin hidrolizar. Resultados similares de la correlación positiva de la actividad antioxidante con respecto al GH se obtuvieron en estudios realizados en esqueleto de salmón (*Salmo sp.*) (Slizyte et al., 2016), vísceras de atún (*Katsuwonus pelmamis*) (Klomklao & Benjakul, 2018) y músculo de abadejo (*Theragra chalcogramma*) (C. Liu et al., 2018).

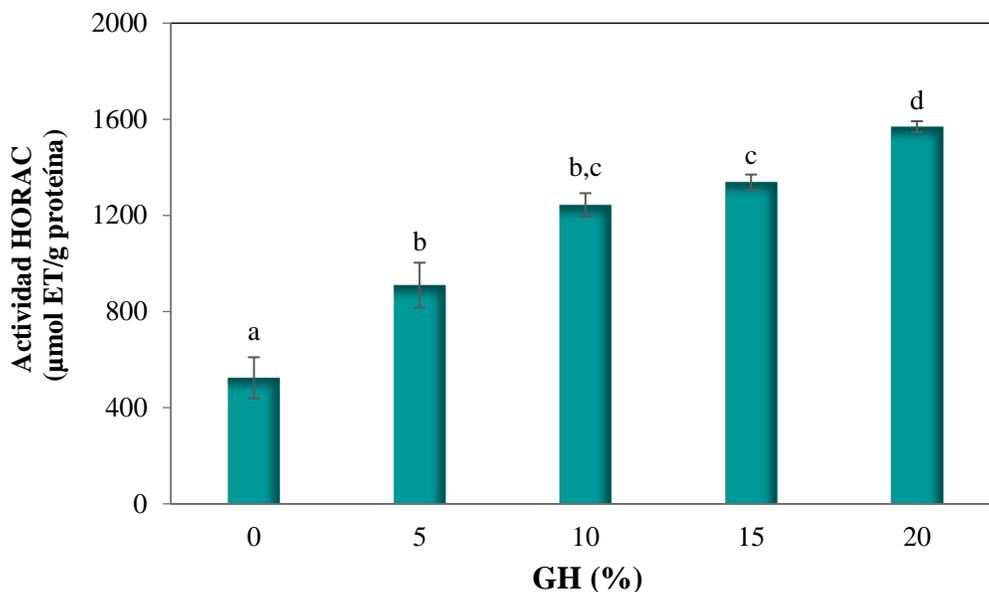


Figura 4.19. Actividad antioxidante (ORAC) de HT a diferentes GH. Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

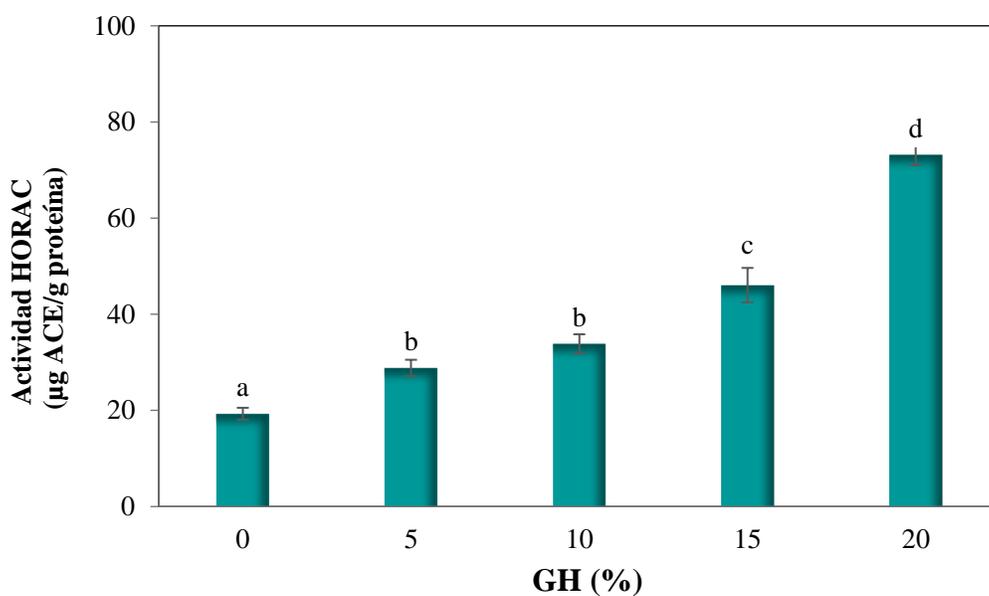


Figura 4.20. Actividad antioxidante (HORAC) de HT a diferentes GH. Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

Las actividades antioxidantes de captación de radicales peroxilo (ORAC) y quelación de metales por medio de la inhibición de la formación de radicales hidroxilo (HORAC) de HT a diferentes GH se muestran en la Figura 4.19 y Figura 4.20, respectivamente. Los valores de ORAC en este estudio oscilaron entre $524,3 \pm 85,6$ a $1569,1 \pm 22,8$ $\mu\text{mol ET/g}$ de proteína y los de HORAC entre $19,32 \pm 1,23$ a $73,15 \pm 2,13$ $\mu\text{g ACE/g}$ de proteína. Si bien los resultados muestran que HT a todos los GH posee capacidad antioxidante, la hidrólisis con Alcalasa® 2.4L durante 6 minutos (GH 5%) ocasionó un incremento del efecto secuestrante de radicales ROO^\bullet y $^\bullet\text{OH}$ en un 74% y 49%, respectivamente, en comparación con la actividad de las proteínas sin hidrolizar. En la Figura 4.19, se puede observar que la mayor capacidad antioxidante alcanzada con el método ORAC es la obtenida con el GH de 20% con un valor de $1569,1 \pm 22,8$ $\mu\text{mol ET/g}$ de proteína ($p < 0,05$), valor similar al reportado para hidrolizados de vísceras de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) con Alcalasa® 2.4L por Gómez et al. (2019) el cual alcanzó un valor de $1554,2 \pm 39,5$ $\mu\text{mol ET/g}$ de proteína para un GH de 43%. No obstante, este valor es superior al reportado por Neves, Harnedy, O’Keeffe, Alashi, et al. (2017), el cual fue de $197,84 \pm 20,69$ $\mu\text{mol ET/g}$ alcanzado con un GH de 23,16% para la hidrólisis de gelatina de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con Alcalasa® 2.4L. Por su parte, el ensayo HORAC que mide la capacidad que tienen los antioxidantes para quelar metales por medio de la inhibición de la formación de radicales $^\bullet\text{OH}$, los cuales se forman partir del anión superóxido y peróxido de hidrógeno en presencia de iones metálicos (Orsini Delgado et al., 2015; Y. Zhang, Duan, & Zhuang, 2012), presentó como resultado para HT a un GH de 20%, con una actividad antioxidante 4 veces mayor ($73,15 \pm 2,13$ $\mu\text{g ACE/g}$ de proteína) que el valor obtenido para GH 0% (Figura 4.20). Sin embargo, los valores reportados por Y. Zhang et al. (2012), para los hidrolizados de gelatina de piel de tilapia (*Oreochromis niloticus*), al igual que lo resultados reportados por Harada et al. (2011) para medusa gigante (*Nemopilema nomurai*), poseen mayor actividad quelante de metales, debido a que reportan valores superiores. Los resultados anteriores para ORAC y HORAC, sugieren que los hidrolizados de víscera de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L puede transferir átomos de hidrógeno para inhibir la oxidación inducida por radicales peroxilo y quelar metales por medio de la inhibición de la formación de radicales hidroxilo, respectivamente.

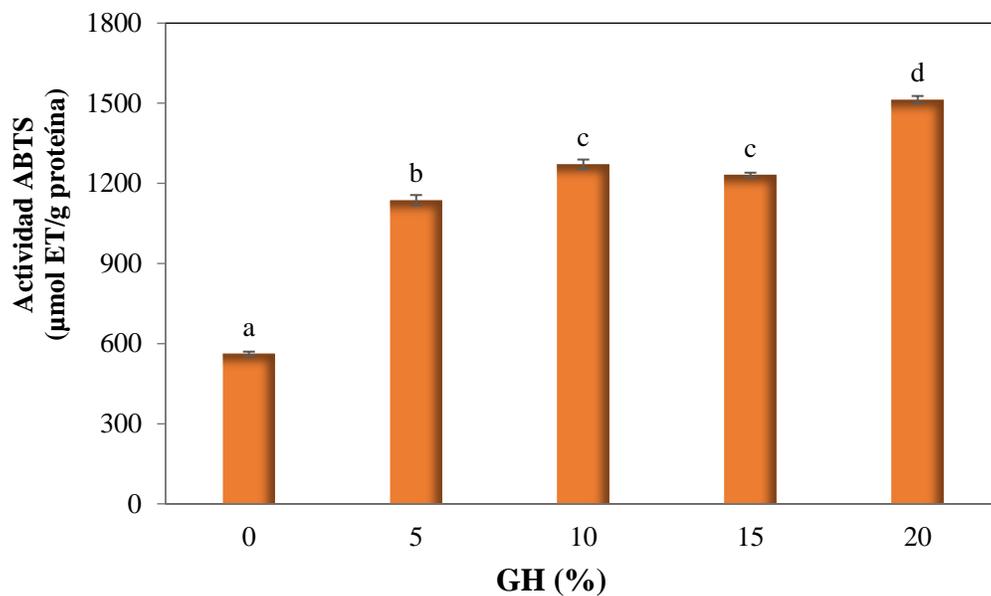


Figura 4.21. Actividad antioxidante (ABTS) de HT a diferentes GH. Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

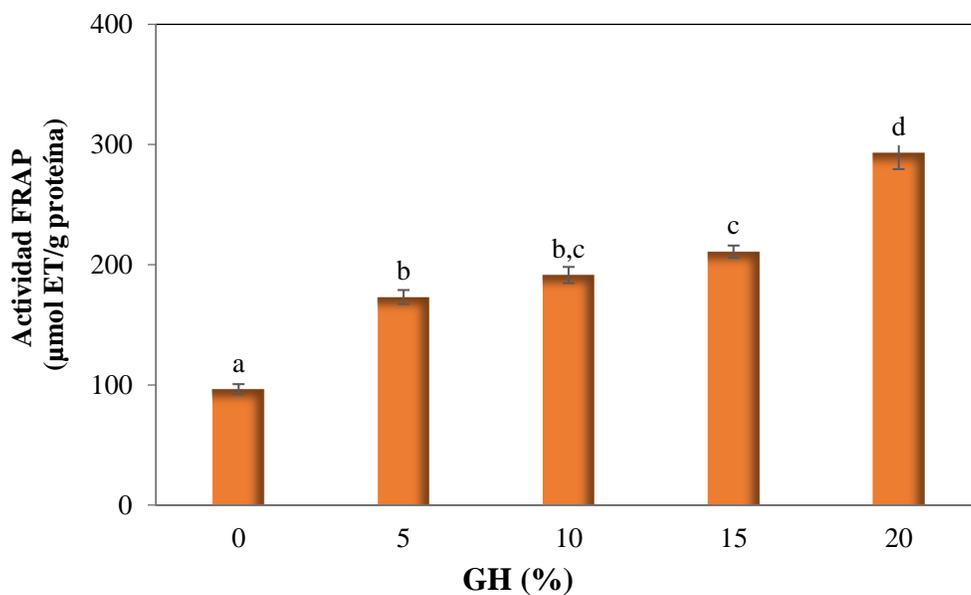


Figura 4.22. Actividad antioxidante (FRAP) de HT a diferentes GH. Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los resultados de actividad antioxidante de HT a los diferentes GH para los ensayos basados en reacciones de transferencia de electrones, ABTS y FRAP, se muestran en las Figuras 4.21 y Figura 4.22, respectivamente. El método ABTS, el cual determina la actividad antioxidante de un compuesto por su capacidad de neutralizar el radical ABTS (Sveinsdottir et al., 2014) mostró diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes GH ($p < 0,05$) a excepción de los GH de 10% y 15% (Figura 4.21). Al igual que los métodos HAT, la mayor actividad de captación de radicales ABTS se encontró en el hidrolizado con GH de 20% ($1514,59 \pm 13,23 \mu\text{mol ET/g}$ de proteína) con un valor IC_{50} de $0,076 \pm 0,010 \text{ mg/mL}$, y un incremento de 3 veces la actividad con respecto a la proteína intacta (GH 0%). De igual forma, el método FRAP que se usa para determinar la capacidad que posee una sustancia para reducir el complejo TPTZ-Fe (III) a complejo TPTZ-Fe (II) (Pulido et al., 2000), mostró que a medida que el GH aumentaba, el valor FRAP crecía ($p < 0,05$) y que la mayor actividad se presentó a un GH de 20% ($p < 0,05$) (Figura 4.22), con un valor de $293,11 \pm 13,58 \mu\text{mol ET/g}$ de proteína y un IC_{50} de $0,346 \pm 0,023 \text{ mg/mL}$. Estos valores encontrados para ABTS y FRAP son ligeramente más altos que los obtenidos por Nikoo et al. (2019) para la hidrólisis de subproductos (Cabeza, vísceras, aletas y esqueleto) de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con alcalasa, el cual reportó un valor para ABTS alrededor de $1200 \mu\text{mol ET/g}$ y para FRAP de $200 \mu\text{mol Trolox/g}$. Sin embargo, el valor de ABTS para HT fue menor que el reportado por Suwal et al. (2018) para el hidrolizado de esqueleto de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa® 2.4L ($140,47 \pm 3,77 \mu\text{mol ET/mg}$ de proteína). No obstante, estos resultados indican que HT, especialmente a un GH de 20%, tiene la capacidad antioxidante de donar un átomo de hidrógeno o un electrón para estabilizar los radicales libres, lo que podría prevenir o retrasar su generación y propagación (Sveinsdottir et al., 2014). Dicha capacidad antioxidante podría estar relacionada con su composición de aminoácidos (Tabla 4.12), donde se encontró que los aminoácidos mayoritarios en HT son Glu/Gln y Asp/Asn, los cuales tienen fuertes efectos antioxidantes debido a la presencia de electrones en exceso, que pueden donarse fácilmente para extinguir los radicales libres (Girgih et al., 2015; R. He et al., 2013).

4.5.2. Impacto del fraccionamiento de los hidrolizados sobre la actividad antioxidante

Una vez obtenido el hidrolizado con mayor actividad antioxidante (HT con GH = 20%), se fraccionó mediante un proceso de ultrafiltración en serie, utilizando membranas de celulosa regenerada con MWCO de 100 kDa, 10 kDa y 3 kDa, obteniendo así cuatro fracciones: HT-F1 (MW > 100 kDa), HT-F2 (100 – 10 kDa), HT-F3 (10 – 3 kDa) y HT-F4 (MW < 3 kDa), a las cuales se les determinó su actividad antioxidante empleando los métodos ORAC, HORAC, ABTS y FRAP, como se muestra en la Tabla 4.17. Los resultados muestran un incremento en la actividad antioxidante a medida que el peso molecular de las fracciones disminuye, obteniéndose la actividad antioxidante significativamente más alta con HT-F4 ($p < 0,05$) para la captación de los radicales peroxilo (ORAC), ABTS y FRAP. Demostrando esto que el peso molecular también afecta la actividad antioxidante de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L, lo cual concuerda con diversos estudios donde se resalta la correlación entre el peso molecular de los hidrolizados de proteínas y las propiedades antioxidantes, como por ejemplo los estudios reportados para hidrolizados de cabezas de atún barrilete (*Katsuwonus pelamis*) (L. Zhang et al., 2019), músculo de anguila (*monopterus sp*) (Halim et al., 2018) y subproductos de bacalao (*Gadus morhua*) (Sabeena Farvin et al., 2016). Sin embargo, en el caso de quelar metales inhibiendo la formación de los radicales hidroxilo (HORAC), no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre HT-F4 y HT ($p > 0,05$).

En la Tabla 4.17 se puede observar que los valores IC_{50} para el ensayo ORAC y las curvas de dosis-respuesta se presentan en el Anexo I. Se encontraron valores IC_{50} entre 0,012 y 0,059 mg de proteína/mL, siendo el valor significativamente más alto para la fracción con peso molecular mayor a 100 kDa (HT-F1), seguido de las fracciones HT-F2 y HT-F3. Asimismo, el valor más bajo se obtuvo para la fracción HT-F4, indicando esto que su actividad antioxidante es significativamente mayor ($p < 0,05$) que el resto de las fracciones. Si bien el hidrolizado completo (HT) presentó un IC_{50} de 0,023 mg de proteína/mL, el proceso de fraccionamiento mejoró la capacidad antioxidante de los hidrolizados, debido a que se logró disminuir en un 45% el valor IC_{50} de HT con respecto al valor obtenido para la fracción de menor peso molecular (HT-F4), obteniéndose así un aumento en el efecto secuestrante de radicales ROO^{\bullet} . Por su parte, se observó que la capacidad de captación de radicales ABTS

muestra una dependencia con el tamaño molecular de las fracciones, ya que presentó diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes fracciones y el hidrolizado completo ($p < 0,05$), obteniéndose la mayor actividad antioxidante con HT-F4 ($2329,6 \pm 7,5 \mu\text{mol ET/g}$ de proteína), exhibiendo un aumento en la actividad del 53% con respecto al hidrolizado sin fraccionar (HT). De igual forma, con el método FRAP se encontró que la mayor actividad ($p < 0,05$) la presentó la fracción con peso molecular menor a 3 kDa (HT-F4), con un valor de $609,5 \pm 5,1 \mu\text{mol ET/g}$ de proteína, representando un incremento de 2 veces la actividad con respecto a HT. En cuanto a la inhibición de los radicales hidroxilo (HORAC) las curvas dosis-respuesta se presentan en el Anexo II. Se observó en los resultados que la mayor actividad antioxidante se consigue con el hidrolizado sin fraccionar, presentando un valor IC_{50} de 3,9 mg de proteína/mL, lo que podría atribuirse a los efectos aditivos de todos los péptidos que son responsables de las actividades encontradas en cada una de las fracciones. Sin embargo, el análisis estadístico arrojó que no existen diferencias significativas entre HT y HT-F4, la cual a su vez no presentó diferencias con la fracción HT-F2 ($p > 0,05$).

Tabla 4.17. Actividad antioxidante de las fracciones de HT (GH de 20%) obtenidas por ultrafiltración.

Fracción	ORAC IC₅₀ (mg/mL)	HORAC IC₅₀ (mg/mL)	ABTS ($\mu\text{mol ET/g prot.}$)	FRAP ($\mu\text{mol ET/g prot.}$)
HT	$0,023 \pm 0,002^a$	$4,9 \pm 0,1^a$	$1514,6 \pm 13,2^a$	$293,1 \pm 13,6^a$
HT-F1	$0,059 \pm 0,009^b$	$94,1 \pm 1,8^b$	$817,3 \pm 18,3^b$	$242,9 \pm 6,9^b$
HT-F2	$0,048 \pm 0,006^{b,c}$	$13,2 \pm 0,8^c$	$918,2 \pm 15,6^c$	$430,7 \pm 3,7^c$
HT-F3	$0,047 \pm 0,004^c$	$45,4 \pm 1,2^d$	$1349,8 \pm 21,4^d$	$284,1 \pm 14,0^a$
HT-F4	$0,012 \pm 0,002^d$	$8,1 \pm 0,2^{a,c}$	$2329,6 \pm 7,5^e$	$609,5 \pm 5,1^d$

^{a-e} Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En general, los resultados anteriores demuestran que los péptidos de bajo peso molecular, en este caso menores a 3 kDa, poseen una mejor capacidad antioxidante en comparación con los péptidos de alto peso molecular, y que el fraccionamiento en serie de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L, condujo a una mayor segregación de péptidos con capacidad de reducir el hierro férrico y secuestrar radicales peroxilo y ABTS. Dicha

segregación se puede evidenciar en la población polipeptídica de las fracciones descrita en términos de sus perfiles cromatográficos (Figura 4.23), donde se observa que HT-F4 presenta una alta concentración de péptidos entre los 3 kDa a 0,5 kDa, y una menor cantidad entre los 0,5 kDa a 0,1 kDa, conteniendo este último grupo a los aminoácidos libres presentes, los cuales representan un 16,32% (m/m) de la proteína total de la fracción HT-F4, según lo encontrado en su composición de aminoácidos libres (Tabla 4.18).

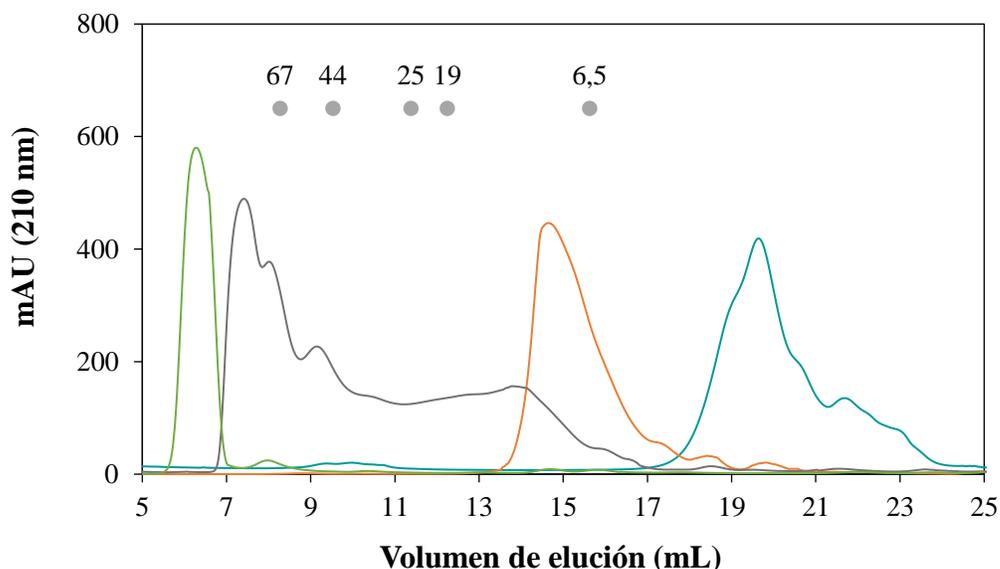


Figura 4.23. Perfiles cromatográficos de las fracciones de HT (GH = 20%), HT-F1 (—) y HT-F2 (—) HT-F3 (—) y HT-F4 (—) en la columna Superdex 75 10/300 GL. (•) Peso molecular de los marcadores en kDa.

Si bien, algunos autores afirman que los aminoácidos libres no son antioxidantes tan eficaces como los péptidos y que la proteólisis extensa da como resultado una disminución en la actividad antioxidante en los hidrolizados (Karami & Akbari-Adergani, 2019; R. Liu et al., 2016; Nwachukwu & Aluko, 2019). Autores como, Tkaczewska et al. (2020), encontraron que la presencia de aminoácidos libres puede incrementar la capacidad antioxidante global (FRAP y DPPH) de los hidrolizados de proteínas de piel de carpa (*Cyprinus carpio*). Así como, Sabeena Farvin et al. (2016), los cuales reportaron que tanto los aminoácidos libres como los péptidos de bajo peso molecular (< 3 kDa) parecían contribuir a la actividad antioxidante de los hidrolizados de proteínas de bacalao (*Gadus morhua*). Sin embargo, es necesario una futura investigación, donde se identifique y

caracterice los péptidos con potencial actividad antioxidante presentes en HT-F4, así como el sinergismo o antagonismo de los aminoácidos libres presentes en dicha fracción.

Tabla 4.18. Composición de aminoácidos libres de la fracción de hidrolizado menor a 3 kDa (HT-F4)

Aminoácido		Concentración (g/100 g proteína)
AAE	Leucina	1,889
	Histidina	0,206
	Isoleucina	0,825
	Lisina	1,278
	Valina	1,136
	Metionina	0,538
	Treonina	0,594
	Fenilalanina	1,080
	Triptófano	0,615
N-AAE	Arginina	1,280
	Tirosina	0,916
	Glicina	0,509
	Ácido Glutámico/Glutamina	1,442
	Serina	0,322
	Ácido Aspártico/Asparagina	0,689
	Cisteína	1,738
	Alanina	1,176
AAE	8,160	
N-AAE	8,072	
Total	16,232	
Aminoácidos hidrofóbicos (%)		61,067

AAE: Aminoácidos esenciales. N-AAE: Aminoácidos no esenciales

Aminoácidos hidrofóbicos: Ile, Leu, Met, Phe, Val, Ala, Pro y Cys.

Diversos autores han demostrado que los péptidos cortos (< 3 kDa) son los que generalmente poseen mejores propiedades antioxidantes, como lo reportó Pezeshk, Ojagh, Rezaei, & Shabanpour (2019) para los hidrolizados enzimáticos de vísceras de atún de aleta amarilla (*Thunnus albacores*), los cuales encontraron que la fracción menor a 3 kDa presentó

mejores capacidades de secuestro de los radicales DPPH y ABTS en comparación con el hidrolizado completo, ya que sus valores IC_{50} disminuyeron en un 50% y 15%, respectivamente. Por su parte, Bordbar, Ebrahimpour, Zarei, Hamid, & Saari (2018) encontraron que la actividad antioxidante de las fracciones de los hidrolizados de músculo de pez piedra (*Actinopyga lecanora*) mostraron una relación inversa con el tamaño molecular de los péptidos; encontrando la mayor actividad en la fracción menor a 2 kDa.

4.6. Evaluación de la actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L (HT)

Los péptidos con capacidad inhibidora de la ECA son de gran interés debido a la incidencia mundial de enfermedades crónicas como la hipertensión, la cual está relacionada con la actividad del sistema renina-angiotensina, y más específicamente con la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Esta enzima elimina dos residuos C-terminales de la angiotensina I biológicamente inactiva, convirtiéndola en angiotensina II, un potente vasoconstrictor, que aumenta la presión sanguínea (Bessada et al., 2019; Sear, 2019). Por lo anterior, se decidió evaluar de forma *in vitro* la capacidad antihipertensiva de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L (HT) por medio de su capacidad de inhibir la ECA, ya que su inhibición se considera una de las estrategias para el tratamiento de la hipertensión, debido a que disminuyendo la actividad enzimática de la ECA se ejerce un efecto vaso-relajante indirecto sobre los vasos sanguíneos (Mada et al., 2019). Inicialmente se evaluó la influencia del GH (0% - 20%) sobre la actividad IECA de los HT y posteriormente, el efecto del fraccionamiento de HT (> 100 kDa, 10 - 100 kDa, 3 - 10 kDa y < 3kDa) sobre dicha actividad.

4.6.1. Influencia del GH sobre la actividad IECA de los hidrolizados

El efecto del GH sobre la actividad IECA de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris se muestra en la Figura 4.24. En los resultados se puede observar que existe una correlación positiva entre el GH y la actividad IECA, presentándose diferencias estadísticamente significativas entre todos los GH ($p < 0,05$) a excepción de los GH de 5 % y 10%, los cuales no presentaron diferencias significativas; además está claro que la hidrólisis con Alcalasa®

2.4L fue esencial para liberar péptidos inhibidores de la ECA contenidos en las proteínas de las vísceras de trucha arcoíris, debido a que se presentó un aumento en la actividad al pasar de un 16,36% en el GH 0% a un 45,01% en el GH 5%. Los valores de IC₅₀ de los hidrolizados enzimáticos a los diferentes GH oscilaron entre 1,23 y 4,99 mg de proteína/mL, encontrándose la actividad IECA más alta a un GH de 20% ($p < 0,05$) con un valor IC₅₀ de $1,230 \pm 0,042$ mg/mL y una inhibición de $80,14 \pm 1,01\%$. Sin embargo, el control positivo Captopril mostró una actividad más alta (99,25%) en comparación con todas las muestras analizadas. No obstante, los resultados anteriores sugieren que los hidrolizados de víscera de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L poseen capacidad antihipertensiva *in vitro*, ya que pueden inhibir la ECA.

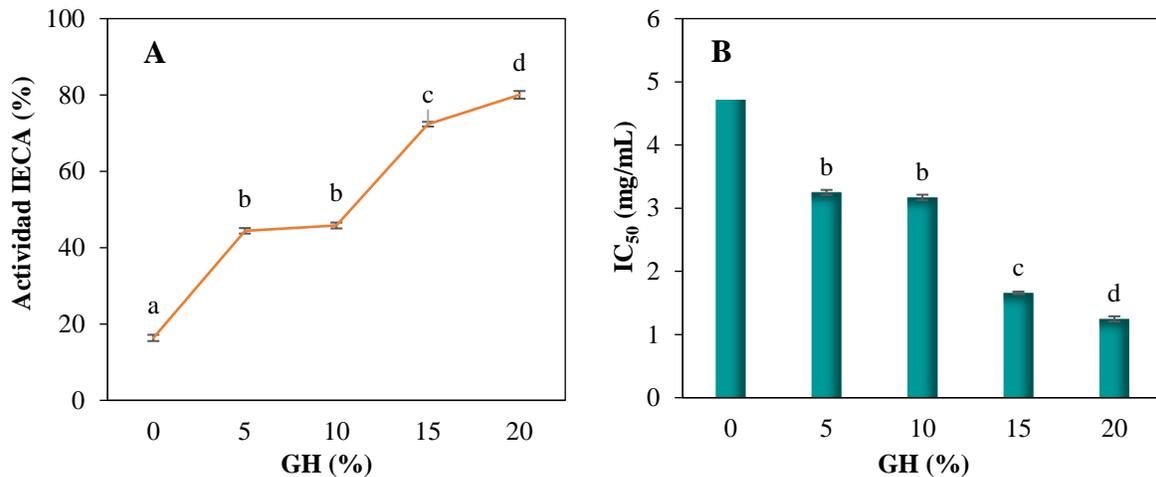


Figura 4.24. Actividad IECA de HT a diferentes GH. A. Inhibición (%) a 3 mg/mL. B. Valores IC₅₀ (mg de proteína/mL). Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

Esta correlación positiva entre el GH y la actividad IECA se debe probablemente a la liberación de una mayor cantidad de péptidos (aumento de la concentración molar) y a la formación de péptidos con secuencias más cortas (entre 2 a 12 aminoácidos de longitud), como se pudo observar en la composición polipeptídica de HT (Figura 4.8 y Figura 4.9), y los cuales son considerados generalmente más potentes como inhibidores de la ECA (Norris et al., 2014; Wilson, Hayes, & Carney, 2011; Yi, De Gobba, Skibsted, & Otte, 2017).

Asimismo, la actividad IECA de los péptidos está relacionada con el tipo de aminoácidos que constituyen su secuencia, por lo tanto, si se analiza la composición de aminoácidos de HT a un GH de 20% (Tabla 4.12), se observa que alrededor del 40% del total pertenece a los aminoácidos hidrofóbicos, entre los que se encuentran Ile, Leu, Phe, Val y Pro, los cuales han sido identificados en los péptidos más efectivos en la inhibición de la ECA, ya que al estar presentes en la secuencia peptídica promueven la interacción hidrofóbica en el sitio activo de la ECA, lo que implica una inhibición de la enzima (Mada et al., 2019; Toldra, Reig, Aristoy, & Mora, 2018).

Diversas investigaciones sobre la actividad IECA de los hidrolizados de subproductos de pescado han encontrado la influencia positiva del GH sobre dicha actividad, siendo consistente con los resultados encontrados para los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris. Entre estos resultados se encuentran los reportados por Neves, Harnedy, O’Keeffe, & FitzGerald (2017), para hidrolizados de subproductos (piel, hueso y carne residual) de salmón (*Salmo salar*) con Alcalasa® 2.4L, los cuales encontraron que los valores IC₅₀ para la actividad IECA pasaron de 3,68 ± 0,30 mg/mL en la proteína sin hidrolizar a 0,74 ± 0,07 mg/mL luego de 4h de hidrólisis (GH 18,33%). Asimismo, Toopcham, Mes, Wichers, Roytrakul, & Yongsawatdigul (2017), reportaron que la actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados de la proteína sarcoplásmica del músculo de tilapia (*Oreochromis niloticus*) también aumentó con el tiempo de hidrólisis, incrementando alrededor de un 40% entre las 2h a 8h de reacción (GH 38%), logrando un valor IC₅₀ de 1,15 mg/mL. Por su parte, Yi et al. (2017), no encontraron actividad IECA en las proteínas de piel de carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) sin hidrolizar, sin embargo, al someterlas a un proceso de hidrólisis enzimática con Alcalasa® 2.4L notaron que la actividad IECA incrementaba con el GH, reportando un valor IC₅₀ de 0,12 mg/mL. Si bien los valores IC₅₀ reportados en los estudios anteriores son inferiores al encontrado para HT con GH 20% (1,230 ± 0,042 mg/mL) mostrando mayor actividad IECA, otras investigaciones realizadas en hidrolizados de subproductos de pescado reportaron valores IC₅₀ similares, como por ejemplo, los hidrolizados de piel de basa (Y. Zhang, Ma, & Otte, 2016), músculo de carpa blanca (Elavarasan, Shamasundar, Badii, & Howell, 2016), cabezas de sardina (Martínez-Alvarez,

Batista, Ramos, & Montero, 2016) y músculo de gobio (R. Nasri et al., 2013), con valores IC_{50} de 1,417; 1,53, 1,16 y 1,33 mg/mL, respectivamente.

4.6.2. Impacto del fraccionamiento sobre la actividad IECA de los hidrolizados

Al igual que con los resultados de actividad antioxidante, el hidrolizado con mayor actividad IECA fue el obtenido a un GH de 20%, el cual se fraccionó utilizando membranas de celulosa regenerada, obteniendo cuatro fracciones: HT-F1 (MW > 100 kDa), HT-F2 (100 – 10 kDa), HT-F3 (10 – 3 kDa) y HT-F4 (MW < 3 kDa), a las cuales se les determinó de forma *in vitro* la actividad IECA reportada como valor IC_{50} , como se muestra en la Figura 4.25. En los resultados se puede observar que la fracción de péptidos menores a 3 kDa (HT-F4) presenta la actividad IECA significativamente más altas en comparación con las otras tres fracciones de péptidos y el hidrolizado original ($p < 0,05$), con un valor IC_{50} de $0,28 \pm 0,01$ mg de proteína/mL, representando una disminución del 77% en comparación con el valor del hidrolizado sin fraccionar. Además, se observa que una alta concentración de péptidos grandes (MW > 10 kDa), como los contenidos en las fracciones HT-F1 y HT-F2 conduce a una disminución de la actividad IECA, debido a que presentaron valores IC_{50} significativamente más altos en comparación con HT ($p < 0,05$). Lo anterior demuestra que el peso molecular de los péptidos también afecta la actividad IECA de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris, así como también se demuestra que el uso de Alcalasa® 2.4L es eficiente para la producción de péptidos inhibidores de la ECA. Autores como Nasir & Sarbon (2019); Neves, Harnedy, O’Keeffe, & FitzGerald (2017) y Yi et al. (2017) encontraron que la alcalasa produce una secuencia peptídica comparativamente más corta (MW < 3 kDa) que mejora la actividad inhibidora de la ECA, lo cual puede deberse a que este tipo de enzima prefiere escindir enlaces peptídicos con aminoácidos hidrofóbicos, dejándolos expuestos en la posición C-terminal y por lo tanto disponibles para interactuar en el sitio activo de la ECA generando su inhibición (Abdelhedi & Nasri, 2019; Hanafi et al., 2018; Mada et al., 2019).

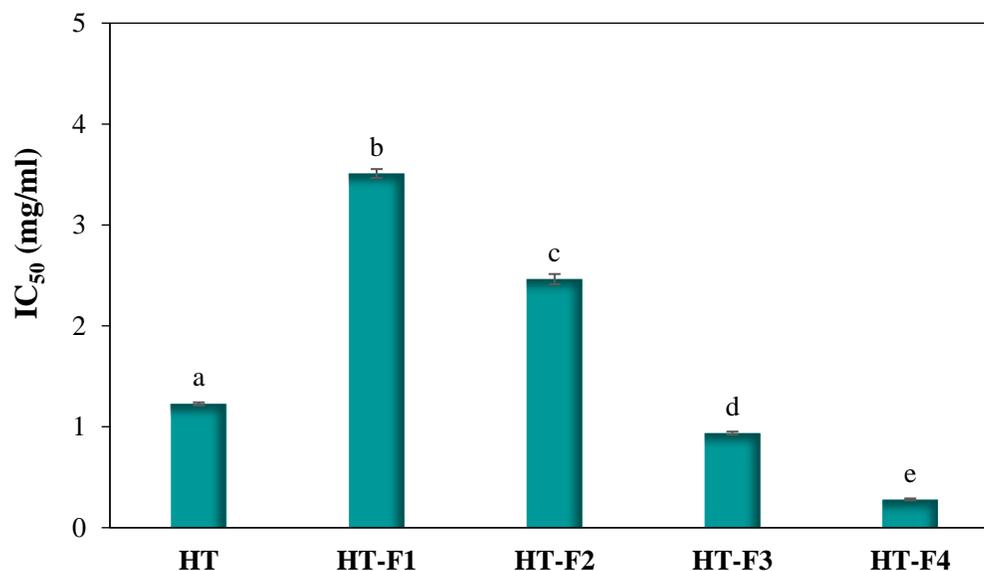


Figura 4.25. Actividad IECA de las fracciones de HT. Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

Diversos estudios concuerdan con la correlación que existe entre el peso molecular de los hidrolizados de proteínas de subproductos de pescado y la actividad inhibidora de la ECA. Roslan, Mustapa Kamal, Yunos, & Abdullah (2017), evaluaron el efecto que podía tener un proceso de ultrafiltración sobre la actividad IECA de los hidrolizados de cabeza, espaldas y cola de tilapia roja (*Oreochromis niloticus*) con Alcalasa® 2.4L, encontrando que la actividad IECA de la fracción de 5 kDa fue mayor en comparación con la fracción de 10 kDa con valores de 71,83% y 64,32%, respectivamente. De igual manera, C. Zhang, Zhang, Wang, Chen, & Luo (2017) reportaron que el fraccionamiento de hidrolizados enzimáticos de músculo de carpa (*Hypophthalmichthys nobilis*) mejoró la actividad IECA pasando de 80% en el hidrolizado original a un 95% en la fracción menor a 3 kDa. Por su parte, Ngo et al. (2016), encontraron que la fracción < 1 kDa de los hidrolizados enzimáticos de piel de bacalao del Pacífico (*G. macrocephalus*) poseía la mayor actividad IECA con un 70% a 500 $\mu\text{g/mL}$. Confirmando lo anterior que los péptidos cortos son los que generalmente poseen mejores propiedades inhibidoras de la ECA. Así entonces, al comparar los valores IC₅₀ de los péptidos contenidos en HT-F4 ($0,28 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$) con los publicados por otros autores, se encontró que este valor es inferior al reportado por Thuanthong et al. (2017) de 1,2 mg/mL para la fracción < 1 kDa de los hidrolizados de piel tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*),

a su vez, es similar al encontrado por Martínez-Alvarez, Batista, Ramos, & Montero (2016) de 0,27 mg/mL para péptidos < 1 kDa de hidrolizados de cabeza de atún. Sin embargo, es superior al reportado por Ketnawa, Suwal, Huang, & Liceaga (2018) para hidrolizados de esqueleto de trucha arcoíris, el cual fue de 0,0036 mg/mL para la fracción menor 1kDa. No obstante, los resultados anteriores demuestran que los péptidos de HT menores a 3 kDa tienen la habilidad de inhibir la enzima convertidora de la angiotensina (ECA).

4.7. Evaluación de la actividad anticoagulante de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L (HT)

Los eventos trombóticos causados por la coagulación de la sangre juegan un papel importante en las enfermedades cardiovasculares, y aunque actualmente existen anticoagulantes sintéticos para tratar estas enfermedades, estos presentan efectos secundarios perjudiciales para la salud (Indumathi & Mehta, 2016). Por lo tanto, se buscan alternativas naturales, como pueden ser péptidos bioactivos de ciertas proteínas alimenticias. Sin embargo, a pesar de las características benéficas que pueden presentar los péptidos como compuestos anticoagulantes, rara vez se han aislado de hidrolizados enzimáticos de subproductos de pescado (Benjakul et al., 2014; M. Nasri, 2017; Ngo et al., 2013; Saadi et al., 2015). A pesar de lo anterior, se decidió evaluar la capacidad anticoagulante de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L (HT) a diferentes GH (0% - 20%), por medio de los ensayos *in vitro* de tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) y tiempo de protrombina (PT), ambos basados en el tiempo de coagulación.

4.7.1. Influencia del GH sobre la actividad anticoagulante de los hidrolizados

La actividad anticoagulación medida por el ensayo de tiempo de protrombina (PT) para HT a diferentes GH se muestran en la Figura 4.26. Con este ensayo se evaluó la posible capacidad anticoagulante que pueden poseer los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris al retrasar el tiempo de activación de la protrombina, y de los factores V, VII y X presentes en la vía de coagulación extrínseca y común (Wahed et al., 2020), al compararlo con el tiempo en el que tardó el plasma en coagular (control). Los resultados muestran que no existe

diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los HT a GH de 0% a 15% y el control. No obstante, se encontró que HT a GH de 20% presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control, exhibiendo los valores más altos para PT ($24,2 \pm 0,7s$), sin embargo, este aumento solo representó una prolongación de 2,7s en el tiempo de coagulación, lo cual no sería significativo al compararlo con los tiempos de prolongación encontrados para los hidrolizados proteicos de Nori (*Porphyra yezoensis*) a una concentración de 3,8 mg/mL, que alargaron el tiempo de coagulación normal de 35 s a 115 s (Indumathi & Mehta, 2016), así como los hidrolizados de músculo de gobio Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) a 20 mg/mL, que provocaron una prolongación del tiempo de coagulación en aproximadamente 4 veces con respecto al control (R. Nasri et al., 2012). Si bien los hidrolizados enzimáticos mencionados mostraron una bioactividad significativa, no son comparables a la heparina, un anticoagulante comercial que a 0,05 mg/mL fue capaz de prolongarse por más de 120 s en los ensayos de PT (X. Liu et al., 2018). Lo anterior indica que HT en cualquier GH, no inhiben la activación de la protrombina y de los factores V, VII y X, y por lo tanto no muestran una actividad anticoagulante significativa en la vía extrínseca y común de la coagulación sanguínea. Por su parte, los resultados del ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT) para HT a los diferentes GH, se presentan en la Figura 4.27. Este ensayo que se usó para determinar la capacidad que poseen los hidrolizados para retrasar la activación de los factores XII, XI, X, IX y VIII, necesarios para la formación del activador intrínseco de la protrombina y fibrinógeno (Levy et al., 2019), presentó diferencias significativas entre HT a los diferentes GH y el control ($p < 0,05$), encontrando tiempos de coagulación más bajos para HT, con valores de APTT que oscilaron entre $44,4 \pm 2,1s$ a $58,1 \pm 1,3s$ en comparación con el valor encontrado para el control, el cual fue de $63,2 \pm 1,9s$. Estos resultados sugieren que HT no presenta actividad anticoagulante significativa en la vía intrínseca de coagulación.

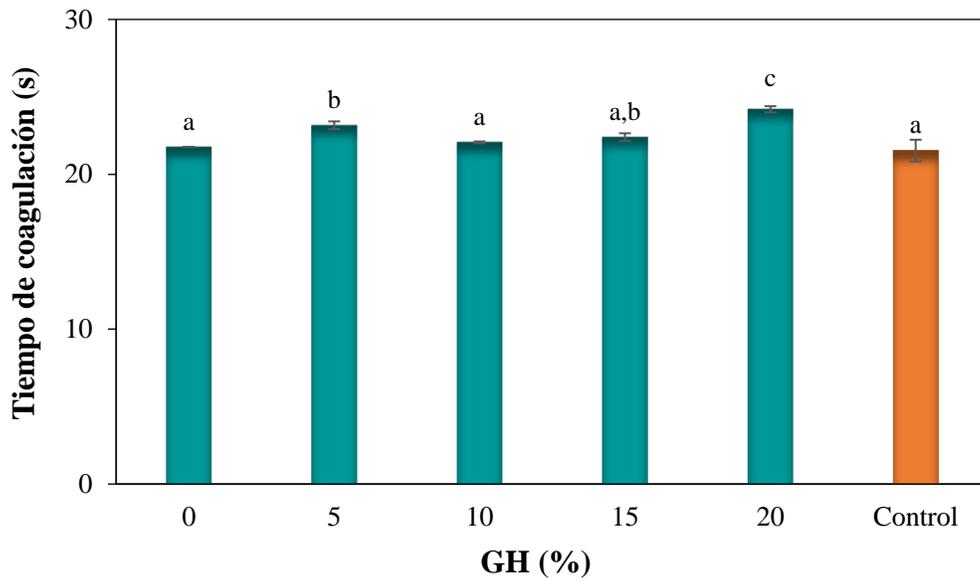


Figura 4.26. Actividad anticoagulante de HT a diferentes GH, medida por el tiempo de protrombina (PT). Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

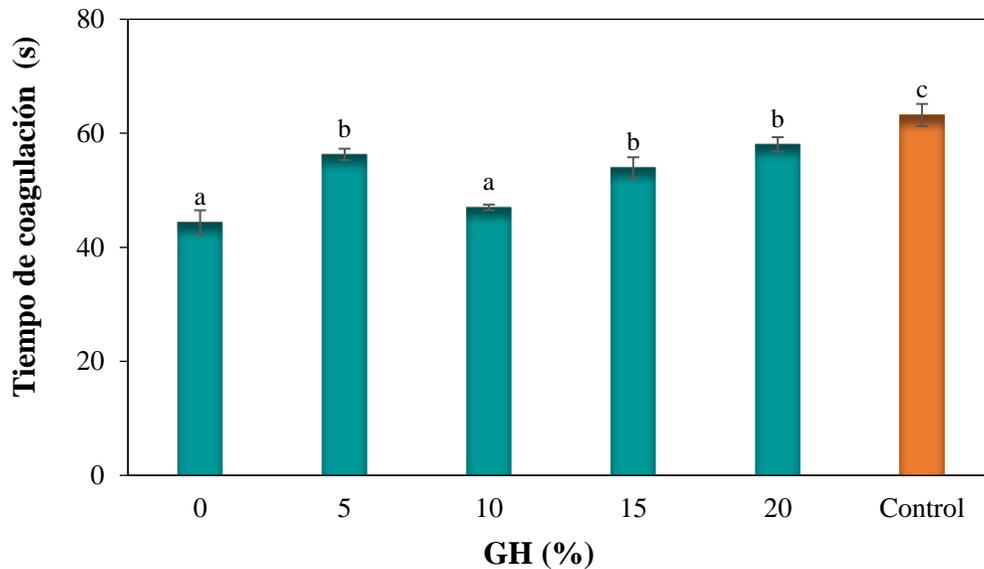


Figura 4.27. Actividad anticoagulante de HT a diferentes GH, medida por el tiempo de tromboplastina parcial activada (APTT). Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los resultados anteriores demuestran que las proteínas y péptidos de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris no poseen actividad anticoagulante, a diferencia de las proteínas y péptidos encontrados en músculo de Gobio (*Zosterisessor ophiocephalus*) (R. Nasri et al., 2012), esqueleto de limanda (*Limanda aspera*) (Rajapakse et al., 2005) y músculo de mejillón (*Mytilus edulis*) (Jo et al., 2008; W.-K. Jung & Kim, 2009). Sin embargo, son muy pocos los resultados publicados sobre este tipo actividad en proteínas y péptidos provenientes de subproductos de pescado. Algunos autores afirman que la mayoría de los anticoagulantes naturales conocidos actualmente y que se encuentran en uso son polisacáridos, siendo los polisacáridos sulfatados de algas marinas los más explorados (de Almeida, Oliveira, & Paresqui, 2018; Indumathi & Mehta, 2016; Jo et al., 2008; Wang, Zhang, Zhang, Song, & Li, 2010).

4.8. Evaluación de la bioaccesibilidad de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L (HT)

Actualmente uno de los mayores desafíos al desarrollar péptidos bioactivos de hidrolizados de subproductos de pescado es establecer su biodisponibilidad, y para esto, los péptidos primero deben resistir la digestión gastrointestinal (GI) y la absorción epitelial intestinal en el tracto digestivo humano, lo cual puede modificar sus características estructurales y por lo tanto, alterar su bioactividad (Abdelhedi & Nasri, 2019; Gallego et al., 2018; Liao et al., 2018; M. Nasri, 2017). Sin embargo, la medición de la biodisponibilidad incluye etapas como la metabolización y la distribución del péptido en tejidos, por lo que solo puede ser determinada por medio de modelos *in vivo* en animales o estudios clínicos, los cuales son altamente costosos y con restricciones éticas (Carbonell-Capella et al., 2014; Galanakis, 2017; Tamer & Çopur, 2016). Es por esto por lo que los enfoques *in vitro*, como es el estudio de la bioaccesibilidad pueden proporcionar información valiosa sobre los cambios que puede sufrir el péptido antes de ser evaluado en animales y/o humanos (Toopcham et al., 2017). Esta bioaccesibilidad de los péptidos, se evalúa por medio de modelos de digestión GI *in vitro*, considerados una herramienta rápida y efectiva para imitar el proceso de digestión, seguido de modelos de absorción en cultivos celulares, como las células Caco-2, derivadas del adenocarcinoma de colon humano, ampliamente utilizadas para predecir la absorción intestinal de las moléculas bioactivas debido a su similitud con las

células del epitelio intestinal (Jones et al., 2019; Liao et al., 2018; Xu et al., 2019). Por lo anterior, se decidió evaluar la bioaccesibilidad de las proteínas de las vísceras de trucha arcoíris (VT) y de su hidrolizado enzimático (HT) obtenido a las condiciones óptimas ($S = 5,45\%$, $e = 0,72$ UA/g, $T = 60^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 8,5$, $G = 5,09\%$ y $v = 102$ rpm), con un GH del 20% (método pH-stat), y así investigar el impacto de la digestión GI simulada sobre las propiedades antioxidantes y antihipertensiva *in vitro*, y su absorción en células Caco-2/TC7.

4.8.1. Digestión gastrointestinal *in vitro* de VT y HT

Se sabe que los péptidos bioactivos pueden liberarse de las proteínas de los alimentos por diversos mecanismos como son la acción de microorganismos durante la fermentación, el uso de enzimas proteolíticas en el proceso de hidrólisis o la acción de las enzimas gastrointestinales una vez que se ingieren las proteínas (Chalamaiah et al., 2012; S.-K. Kim et al., 2012; Sabbione, Nardo, Añón, & Scilingo, 2016). Una alternativa para este último mecanismo sería la digestión gastrointestinal simulada, la cual presenta como ventaja adicional el hecho de que se puede verificar la estabilidad de los péptidos potencialmente activos a través del sistema digestivo (Sabbione et al., 2016). Es por esto por lo que se realizó una digestión GI *in vitro* tanto en VT como en HT, para obtener las vísceras de trucha arcoíris digeridas (VTD) y los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L digeridos (HTD). Lo anterior con el objetivo de comparar las bioactividades de los péptidos generados durante la digestión gastrointestinal con respecto a las bioactividades encontradas con la hidrólisis enzimática, además de conocer la estabilidad de dichos péptidos en el sistema digestivo.

En la Tabla 4.19, se presenta los resultados de GH (%) según el método TNBS, el contenido de proteínas (%) y la longitud promedio de cadena peptídica ($\text{PCL} = 100 / \text{GH}$, Adler-Nissen, 1986), para los digeridos gastrointestinales (VTD y HTD) preparados a partir de las proteínas de VT y HT. Es importante resaltar que el GH obtenido por el método de pH-stat para HT (20%) es diferente al encontrado por el método TNBS (45%), lo cual se debe a que cada método se basa en diferentes principios para medir enlaces peptídicos rotos (Wubshet et al., 2019). En los resultados se observa que existen diferencias significativas

entre los GH de las muestras ($p < 0,05$), además que se presenta un incremento significativo del GH después de la digestión GI simulada ($p < 0,05$), donde VTD obtuvo el mayor incremento, con un aumento de 2,7 veces el GH de VT, lo cual se ve reflejado también en la longitud promedio de cadena peptídica, la cual pasó de 10 aminoácidos aproximadamente en VT a una cadena de 4 aminoácidos en VTD. Sin embargo, el GH alcanzado por VTD fue significativamente menor que los GH obtenidos para HT y HTD ($p < 0,05$), que se debe a la hidrólisis enzimática previa con Alcalasa® 2.4L, la cual también disminuyó la cantidad de aminoácidos presentes en la cadena polipeptídica.

Tabla 4.19. Grado de hidrólisis por el método TNBS, longitud promedio de cadena peptídica (PCL) y proteína (%) de VT, HT y sus digeridos

Muestra	GH (%)	PCL	Proteína (%)
VT	10,50 ± 1,81 ^a	9,73 ± 1,86 ^a	64,83 ± 0,82 ^a
VTD	28,50 ± 4,33 ^b	3,89 ± 0,14 ^b	56,81 ± 1,46 ^b
HT	44,76 ± 2,53 ^c	2,24 ± 0,13 ^c	63,18 ± 1,66 ^a
HTD	55,51 ± 4,28 ^d	1,81 ± 0,14 ^{c,d}	47,94 ± 0,75 ^c

^{a-d} Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Asimismo, las poblaciones polipeptídicas de cada una de las muestras descritas en términos de los perfiles cromatográficos (Filtración en gel - FPLC), se muestran en las Figura 4.28 y Figura 4.29. Los cromatogramas de exclusión molecular obtenidos usando la columna Superdex 75 (Figura 4.28) presentaron cinco fracciones para cada una de las muestras. Se puede demostrar que tanto la hidrólisis con Alcalasa® 2.4L como la digestión gastrointestinal produjeron una disminución en las especies minoritarias presentes entre 60,6 kDa y 13,0kDa, y un aumento en especies moleculares menores de 6,5kDa, siendo el aumento más representativo para las muestras HT y HTD (Tabla 4.20); sin embargo, no se observan grandes diferencias entre estas dos muestras. Caso contrario a lo que ocurre con las vísceras de trucha arcoíris (VT), ya que la digestión causó un aumento en las moléculas menores de 6,5 kDa. Con respecto a cromatogramas de exclusión molecular obtenidos en la columna Superdex peptide (Figura 4.29), se puede ver que la hidrólisis con Alcalasa® 2.4L generó un aumento en el número de moléculas menores de 1,9 kDa, y que similar a lo observado en la

columna anterior, no hay grandes diferencias entre HT y su digerido (HTD), lo cual es contrario a lo que sucedió con las vísceras de trucha arcoíris, ya que la digestión causó un aumento en las moléculas menores de 1,9 kDa (Tabla 4.21).

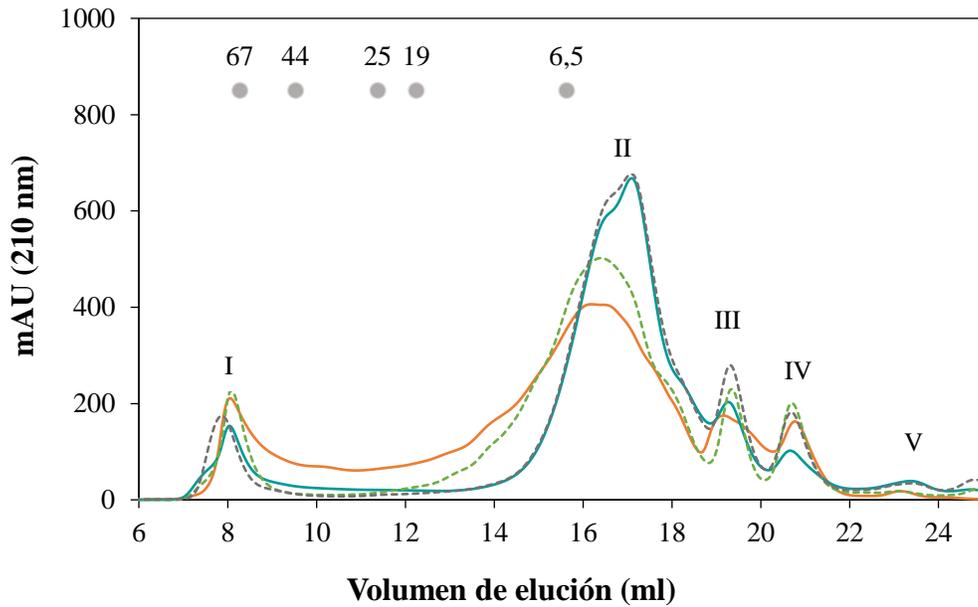


Figura 4.28. Perfiles cromatográficos de VT (—), VTD (---), HT (—) y HTD (---) en la columna Superdex 75 10/300 GL. (•) Peso molecular de los marcadores en kDa.

Tabla 4.20. Rango de pesos moleculares (kDa) correspondientes a los picos presentes en los cromatogramas de la Figura 4.28.

Fracción	VT	VTD	HT	HTD
I	> 44,2	> 60,6	> 56,1	> 56,1
II	13,5 - 2,4	13,0 - 2,3	8,9 - 2,3	9,5 - 2,3
III	2,4 - 1,5	2,3 - 1,6	2,4 - 1,5	2,3 - 1,6
IV	1,4 - 0,9	1,5 - 0,9	1,5 - 1,0	1,5 - 0,9
V	0,7 - 0,5	0,6 - 0,5	0,7 - 0,5	0,7 - 0,5

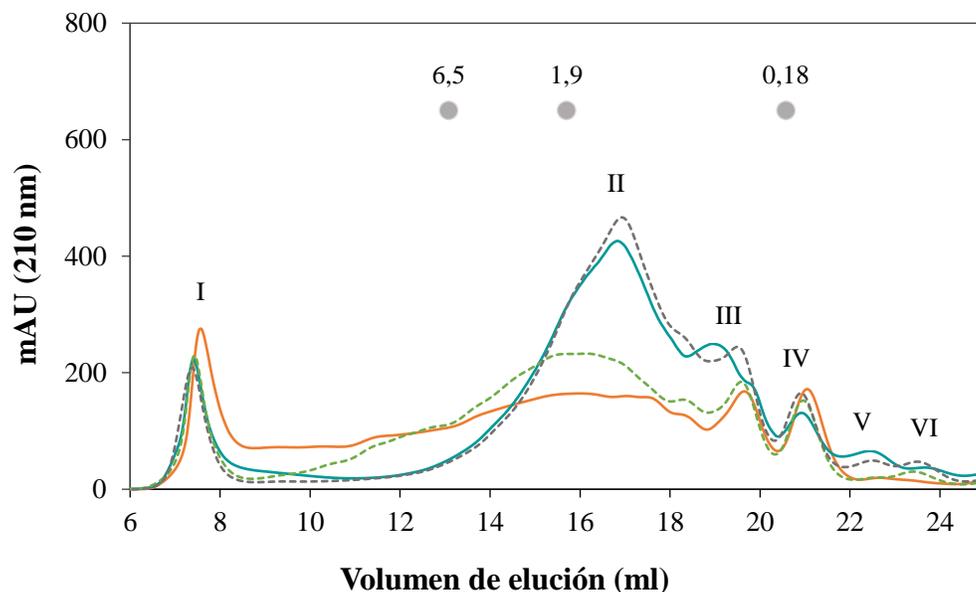


Figura 4.29. Perfiles cromatográficos de VT (—), VTD (---), HT (—) y HTD (---) en la columna Superdex peptide 10/300 GL. (*) Peso molecular de los marcadores en kDa.

Tabla 4.21. Rango de pesos moleculares (kDa) correspondientes a los picos presentes en los cromatogramas de la Figura 4.29.

Fracción	VT	VTD	HT	HTD
I	> 10	> 10	> 10	> 10
II	> 10 - 0,5	>10 - 0,6	7,7 - 0,5	7,2 - 0,4
III	0,5 - 0,4	0,6 - 0,4	0,5 - 0,2	0,4 - 0,2
IV	0,4 - 0,2	0,3 - 0,2	0,2 - 0,1	0,2 - 0,1
V	0,2 - 0,1	0,2 - 0,1	0,1 - 0,05	0,1 - 0,06
VI		0,06 - 0,03	0,04 - 0,03	0,06 - 0,03

4.8.2. Efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* sobre las propiedades bioactivas de VT y HT

Es importante que los hidrolizados y péptidos con propiedades bioactivas permanezcan activos después de la digestión gastrointestinal antes de ejercer sus efectos *in vivo* (Martínez-

Alvarez et al., 2016; Mora, Gallego, Aristoy, Reig, & Toldrá, 2019). Por lo anterior, en este estudio se evaluó el impacto de la digestión GI simulada tanto en las propiedades antioxidantes y antihipertensivas *in vitro* encontradas en HT como las que pueden estar contenidas en VT, y para esto se emplearon los métodos ORAC, HORAC, ABTS y FRAP para evaluar la actividad antioxidante e IECA para la actividad antihipertensiva *in vitro*.

Los resultados para la actividad antioxidante de VT, HT y sus respectivos digeridos VTD y HTD, se presentan en la Figura 4.30. En general se observa que para VT, la actividad antioxidante aumento con la digestión GI simulada ($p < 0,05$), excepto por la capacidad de inhibición de la formación de los radicales hidroxilo (HORAC), en donde no se presentaron diferencias significativas entre VT y VTD ($p > 0,05$). En cuanto a la capacidad secuestrante de radicales ROO^{\bullet} (Figura 4.30A) se observa que la actividad de los péptidos presentes en HT no se vio afectada por de la digestión GI simulada, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre HT y HTD ($p < 0,05$) presentándose valores IC_{50} de $0,026 \pm 0,002$ mg de proteína/mL y $0,031 \pm 0,003$ mg de proteína/mL, respectivamente. Sin embargo, la digestión GI simulada de VT ocasionó un incremento del efecto secuestrante de radicales ROO^{\bullet} ($p < 0,05$), lo cual se ve reflejado en una disminución del 34% del valor IC_{50} de VT en comparación con VTD. Con el método HORAC que evalúa la capacidad antioxidante de quelar metales, inhibiendo la formación de radicales hidroxilo, se encontró que HTD presentó la mayor actividad ($p < 0,05$) en comparación con el resto de las muestras (Figura 4.30B), con un IC_{50} de $3,214 \pm 0,149$ mg de proteína/mL. La capacidad de inhibición de los radicales $\bullet OH$ para HT aumento con la digestión GI simulada, ya que se obtuvo un valor IC_{50} para HTD 30% menor al valor IC_{50} de HT. En cuanto a los métodos ABTS y FRAP (Figura 4.30C y D), los resultados muestran un aumento de la actividad antioxidante luego de la digestión GI simulada, siendo mayor el efecto para VT que para HT, debido a que las actividades para neutralizar radicales ABTS y reducir el complejo férrico Fe^{3+} -TPTZ al complejo ferroso Fe^{2+} -TPTZ encontradas en VTD mostró un incremento de 152% y 197% con respecto a las actividades de VT. Sin embargo, tanto para ABTS como para FRAP, la actividad más alta se encontró para los péptidos presentes en HTD ($p < 0,05$), con valores de $1607,64 \pm 27,12$ μmol ET/g de proteína y $322,75 \pm 2,80$ μmol ET/g de proteína, respectivamente. Lo anterior puede deberse a que la digestión GI produjo fraccionamientos

adicionales de los enlaces peptídicos presentes en HT, lo cual se observa en los resultados de GH, el cual pasó de 44,7% para HT a un 55,5% para HTD, conduciendo esto a una acumulación de péptidos más cortos (tripéptidos y dipéptidos), lo cual se ve reflejado en el leve aumento que hubo en la población polipeptídica menor a 1,9 kDa (Figura 4.29). Sin embargo, los aumentos en la actividad antioxidante ABTS y FRAP de HTD con respecto a HT fueron muy leves, presentando incrementos del 9% y 20%, respectivamente.

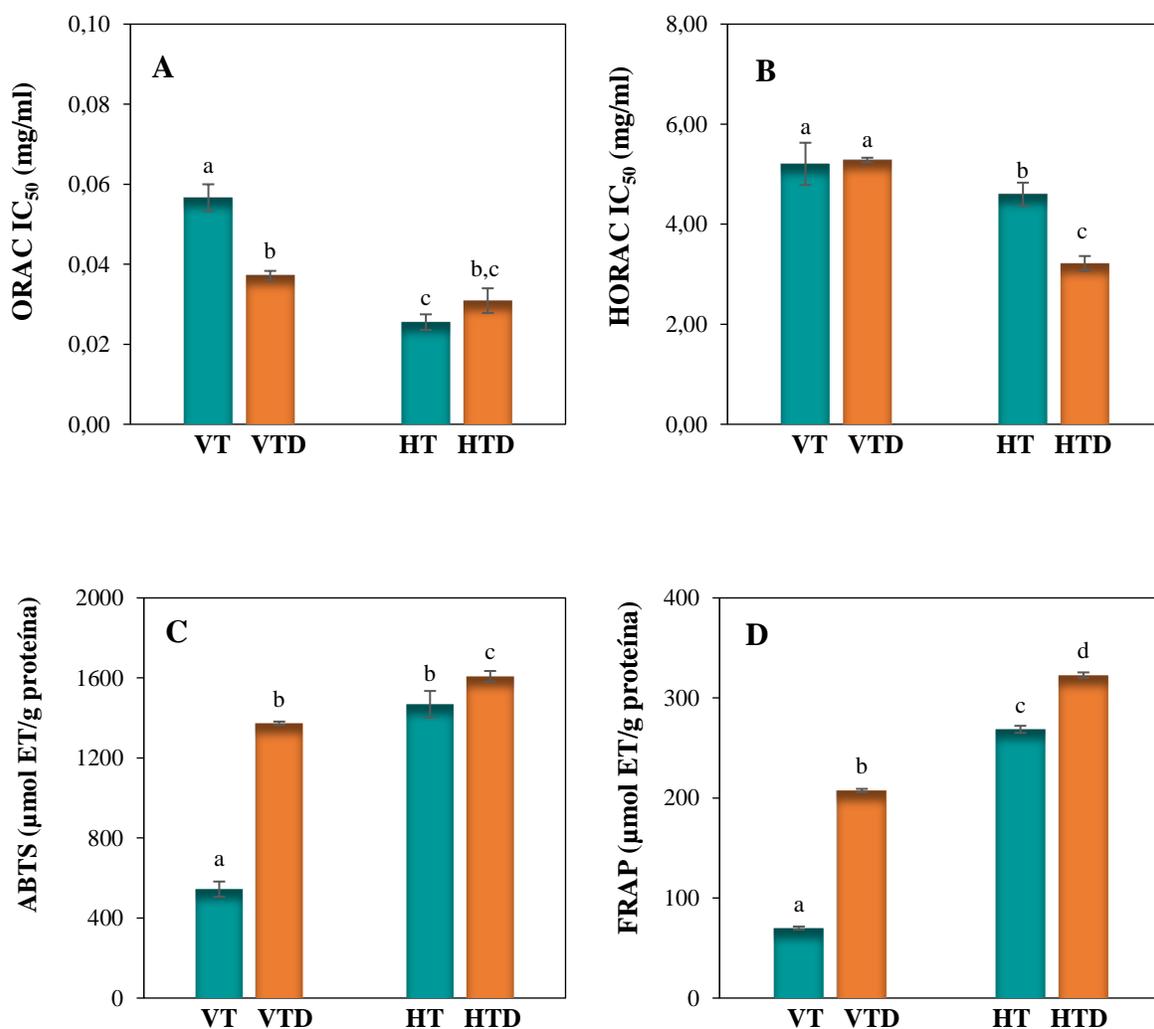


Figura 4.30. Actividad antioxidante de VT, HT y sus digeridos gastrointestinales VTD y HTD. **A.** ORAC. **B.** HORAC. **C.** ABTS. **D.** FRAP. Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los resultados anteriores demuestran la buena resistencia que tienen los péptidos antioxidantes presentes en HT a la digestión GI simulada, además de que una hidrólisis previa con Alcalasa® 2.4L mejora la capacidad antioxidante de las proteínas y péptidos. Estos resultados fueron consistentes con los observados por Ketnawa, Wickramathilaka, & Liceaga (2018) cuales encontraron que los péptidos antioxidantes presentes en los hidrolizados de esqueleto de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa® 2.4L fueron modificados por la digestión gastrointestinal para mejorar sus actividades de eliminación de radicales ABTS y poder reductor (FRAP). Igualmente, Oliveira et al., (2019) reportaron que después de la digestión GI *in vitro* de los hidrolizados de músculo de corvinata pescadilla (*Cynoscion guatucupa*) estos mostraron un aumento en la capacidad de eliminación de radicales hidroxilo y secuestro de ABTS, sin embargo, encontraron una disminución en las actividades de eliminación de radicales DPPH y reducción del complejo férrico (FRAP).

En cuanto al efecto de la digestión GI simulada sobre la actividad IECA de HT y VT, los resultados se muestran en la Figura 4.31. Los valores IC₅₀ para IECA oscilaron entre 1,38 ± 0,03 y 5,29 ± 0,06 mg de proteína/mL, siendo VT el que presentó el mayor valor ($p < 0,05$), y por ende el que presenta la menor actividad IECA en comparación con las otras muestras. Además, se puede observar que existe diferencias estadísticamente significativas entre VT y VTD ($p < 0,05$), encontrándose un valor IC₅₀ para VTD (2,50 ± 0,06 mg/mL) 53% menor que el de VT, demostrando esto que también se pueden generar péptidos bioactivos durante la digestión GI, lo cual se puede evidenciar al comparar las poblaciones polipeptídicas de VT y VTD (Figura 4.28 y 4.29), donde se observa un aumento de los péptidos menores a 6,5 kDa. Sin embargo, los valores IC₅₀ para VTD son más altos a los valores encontrados para HT y HTD ($p < 0,05$), exponiendo esto que al realizar una hidrólisis previa con Alcalasa® 2.4L se mejora la actividad IECA de las proteínas y péptidos de las vísceras de trucha arcoíris. Aunque, el valor IC₅₀ encontrado para HTD (1,49 ± 0,05 mg/mL) fue solamente 8% mayor que el valor de HT (1,38 ± 0,03 mg/mL), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores IC₅₀ de ambas muestras, indicando esto que los péptidos con actividad IECA de HT son resistentes a la digestión GI simulada. Algunos autores afirman que la presencia de aminoácidos como prolina en la composición de los péptidos con actividad IECA ayudan a mejorar la resistencia a la acción de las enzimas digestivas

(Abdelhedi & Nasri, 2019; Norris et al., 2014; Yi et al., 2017), y en el caso de HT, este aminoácido está presente en su composición (Tabla 4.12) y por ende puede estar presente en la secuencia de los péptidos que lo conforman. Resultados similares sobre la resistencia a la digestión GI de los péptidos con actividad IECA han sido reportados para hidrolizados de: músculo de merluza del pacífico (*Merluccius productus*) (Samaranayaka, Kitts, & Li-Chan, 2010), músculo y viseras de atún (*Thunnus thynnus*) (Martínez-Alvarez et al., 2016), piel, hueso y carne residual de salmón (*Salmo salar*) (Neves, Harnedy, O’Keeffe, & FitzGerald, 2017).

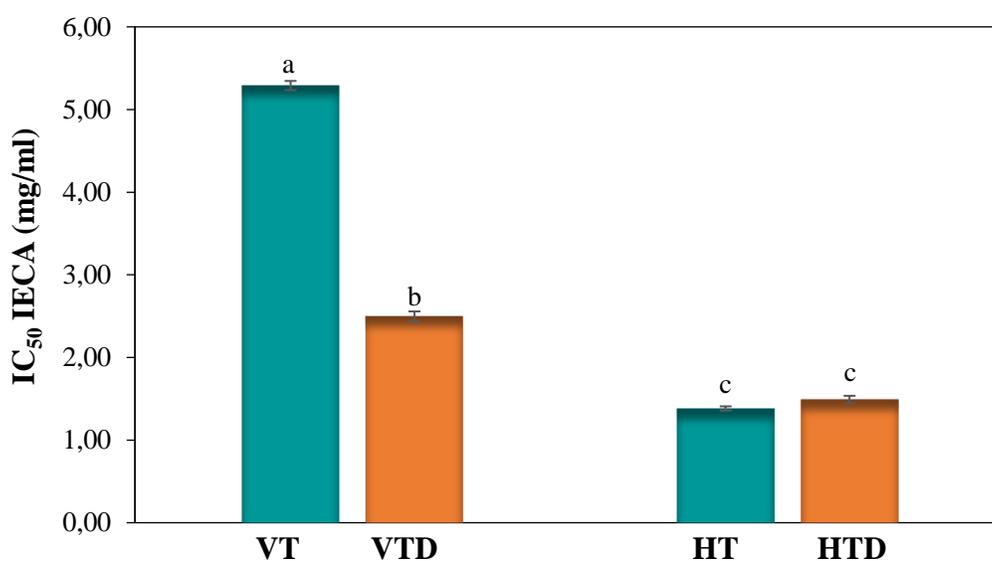


Figura 4.31. Actividad IECA de VT, HT y sus digeridos gastrointestinales VTD y HTD. Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

4.8.3. Determinación de dipéptidos de Histidina (Carnosina y Anserina)

Se determinó el contenido de los dipéptidos con propiedades antioxidantes carnosina (β -alanil-L-histidina) y anserina (metil carnosina; β -alanil-1-metil-L-histidina) en las vísceras de trucha arcoíris (VT), en el hidrolizado enzimático (HT) y en el hidrolizado sometido a digestión GI *in vitro* (HTD), además también se evaluó en la fracción del hidrolizado menor a 3kDa (HT-F4) debido a que esta presentó la mayor actividad antioxidante. Estos dipéptidos

naturales presentes en los tejidos musculares de pescados como el atún, el barrilete, el salmón y la anguila (Ananey-Obiri et al., 2019; G. Wu, 2020; H. Wu, Chen, & Shiau, 2003), son considerados péptidos antioxidantes debido a que actúan como quelante de iones metálicos, inhibidores de la peroxidación de lípidos y especialmente como captadores de radicales libres, debido a la capacidad de donación de protones del grupo de histidina imidazol (Mendis, Rajapakse, & Kim, 2005; Samaranyaka & Li-Chan, 2011). En la Figura 4.32 se presenta la concentración (mg/g de proteína) de los dipéptidos para cada una de las muestras.

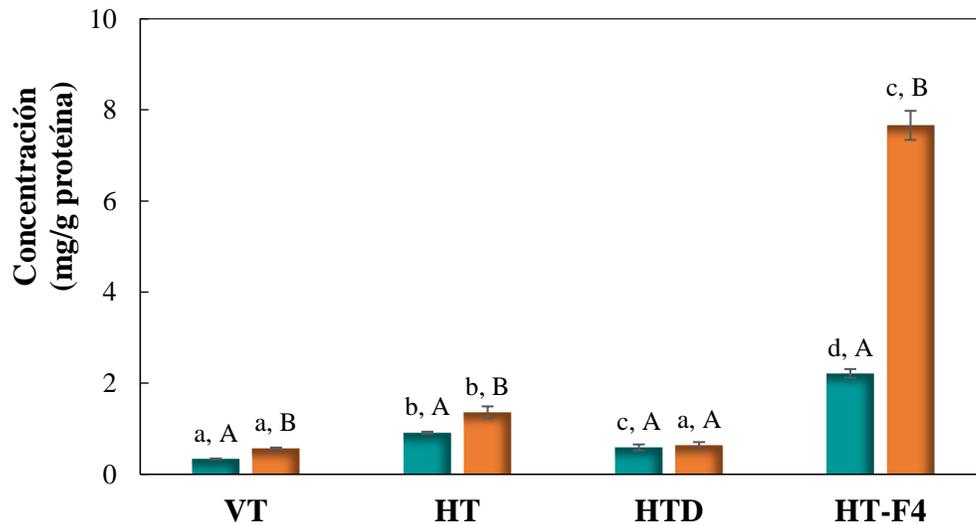


Figura 4.32. Contenido (mg/g de proteína) de carnosina (■) y anserina (■). Letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras para el mismo dipéptido. Letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre carnosina y anserina para la misma muestra. (I) desviaciones estándar.

En los resultados se puede observar que la hidrólisis enzimática de las vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L aumentó el contenido de los dipéptidos carnosina y anserina, encontrándose valores de $0,913 \pm 0,021$ y $1,360 \pm 0,130$ mg de dipéptido/g de proteína, respectivamente; los cuales representaron un aumento de aproximadamente 2,5 veces en comparación con la proteína sin hidrolizar. No obstante, en el caso del hidrolizado sometido a digestión GI *in vitro* (HTD), se presentaron valores inferiores para ambos dipéptidos en comparación con el hidrolizado original HT ($p < 0,05$), observándose que las concentraciones de carnosina y anserina disminuyeron en un 32% y 50%, respectivamente. Lo cual puede ser

debido a que estos compuestos se ven afectados por las condiciones de la digestión GI (pH, concentración y actividad de las enzimas gastrointestinales), siendo el pH del medio, el parámetro más crítico, ya que puede modificar tanto la carga neta de la molécula, como su estructura (Marcolini et al., 2015). Por su parte, HT-F4 presentó los valores más altos de concentración para ambos dipéptidos ($p < 0,05$) en comparación con el resto de las muestras, con concentraciones mayores para anserina (7,660 mg/g de proteína) que para carnosina (2,213 mg/g de proteína). Lo anterior, indica que el fraccionamiento en serie de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L, causó que la concentración de los dipéptidos anserina y carnosina aumentara 2 y 6 veces con respecto al hidrolizado sin fraccionar, respectivamente.

Los valores de concentración de los dipéptidos obtenidos para VT fueron similares a los reportados por Li, Liu, Jiang, & Yan (2019) para cabezas de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), los cuales encontraron valores aproximados de 0,25 y 0,50 mg/g para carnosina y anserina, respectivamente. Asimismo, se encontró que las concentraciones de anserina para HT y HT-F4 son mayores a las reportadas por Sabeena Farvin et al. (2016), los cuales evaluaron el contenido de los dipéptidos de histidina en hidrolizados de proteínas de bacalao (*Gadus morhua*) y sus fracciones, encontrando solo la presencia de anserina, la cual fue mayor en el hidrolizado completo (0,494 mg/g) que en la fracción menor a 3 kDa (0,316 mg/g), contrario a lo encontrado en la presente investigación. Por su parte, H. Wu et al. (2003) reportaron un aumento de la concentración de carnosina y anserina en los hidrolizados enzimáticos de músculo de caballa (*Scomber austriasicus*) al compararlo con el músculo sin hidrolizar.

4.8.4. Fraccionamiento FPLC de VTD y HTD

Una vez obtenidos VTD y HTD, se procedió a su fraccionamiento de acuerdo con su tamaño mediante cromatografía de exclusión molecular (FPLC), usando una columna semi-preparativa Peptide 10/300, y sus cromatogramas se muestran en la Figura 4.33A.. A cada fracción se le realizó una evaluación de su actividad antioxidante, con el objetivo de conocer en que rango de pesos moleculares se encuentran los péptidos más activos, para lo cual se usaron los métodos ORAC y HORAC, los resultados se presentan en la Figura 4.33 B y C.

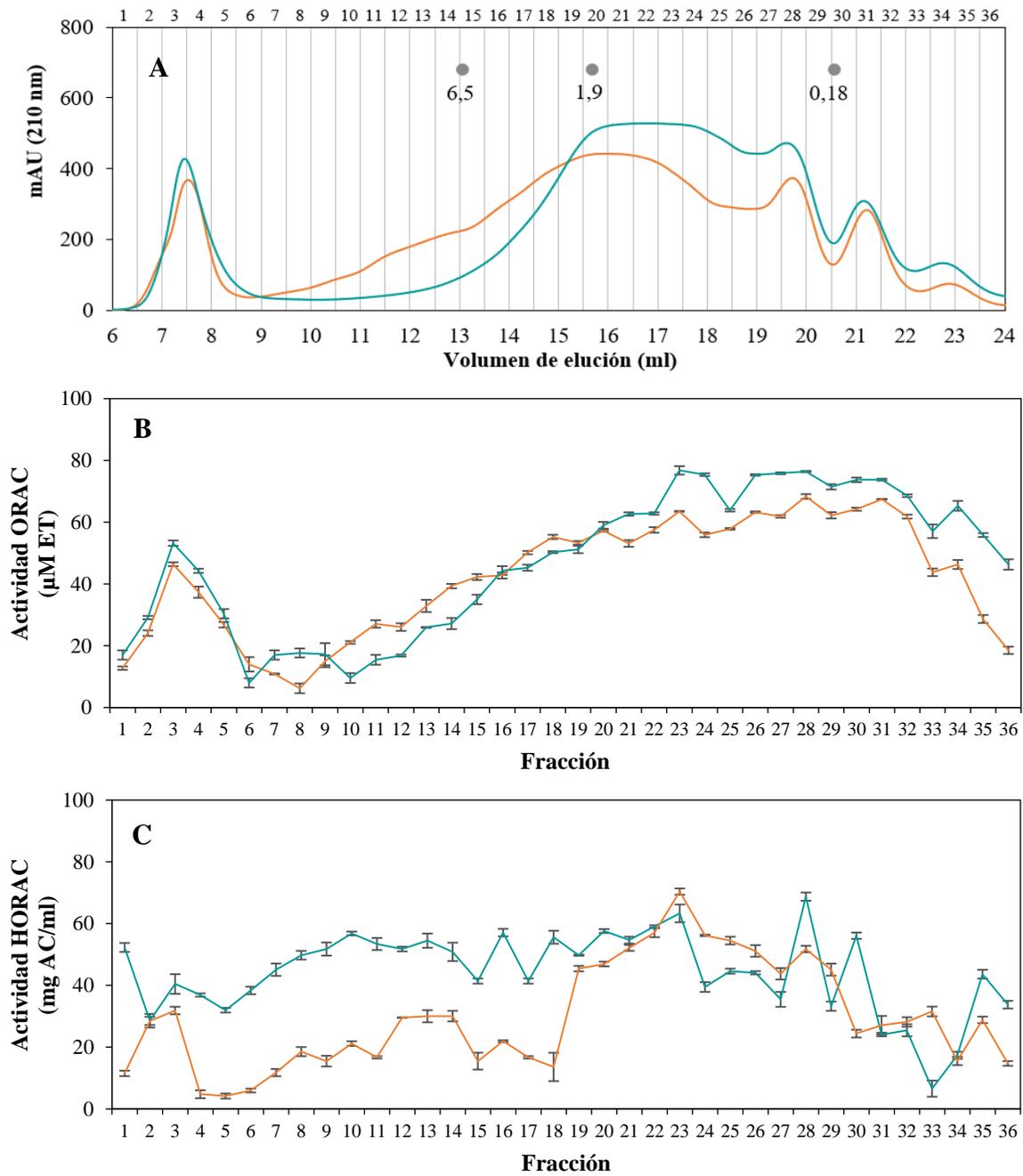


Figura 4.33. A. Perfiles cromatográficos FPLC indicando las fracciones obtenidas para VTD (—) y HTD (—). B. Actividad ORAC. C. Actividad HORAC de las fracciones de VTD (—) y HTD (—). (*) Peso molecular de los marcadores en kDa. Las barras representan la desviación estándar.

Los resultados obtenidos para la capacidad de secuestro de radicales peroxilo (ORAC) de las fracciones obtenidas a partir de ambos digeridos (Figura 4.33B), muestran que las mayores actividades antioxidantes se presentaron en las fracciones comprendidas entre la 20 y la 31 correspondientes a pesos moleculares de entre 1,9 y 0,14 kDa, con valores que oscilan entre $76,79 \pm 1,37 \mu\text{M ET}$ y $58,99 \pm 1,10 \mu\text{M ET}$ para HTD, y entre $68,34 \pm 0,76 \mu\text{M ET}$ y $53,13 \pm 1,09 \mu\text{M ET}$ para VTD. Sin embargo, se observa en los resultados obtenidos para las fracciones de HTD presentan actividades ligeramente mayores en comparación con las fracciones de VTD. En el caso de los resultados obtenidos para HORAC, se observa que la actividad antioxidante de las fracciones de HTD comprendidas entre la 1 y la 22 presentan una actividad mayor que las fracciones de VTD, sin embargo, luego de la fracción 23 de ambos digeridos, la actividad tiende a valores similares. Debido a los resultados anteriores, se decidió seleccionar las dos fracciones con mayor actividad antioxidante ORAC de ambos digeridos, para ser evaluadas posteriormente en los ensayos de la absorción intestinal con células Caco-2/TC7. Por consiguiente, las fracciones seleccionadas en VTD fueron la 28 y la 31 (VTD-28, VTD-31) con valores ORAC de $68,34 \pm 0,76 \mu\text{M ET}$ y $67,44 \pm 0,11 \mu\text{M ET}$, respectivamente. En el caso de HTD fueron la 23 y la 28 (HTD-23, HTD-28) con valores $76,79 \pm 1,37 \mu\text{M ET}$ y $76,42 \pm 0,19 \mu\text{M ET}$, respectivamente.

4.8.5. Simulación de la absorción intestinal de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris sobre células Caco-2/TC7

Debido a los resultados obtenidos en las propiedades bioactivas (antioxidante e IECA), se decidió simular la absorción intestinal de los péptidos contenidos en HT y sus fracciones HT-F3 (10 – 3 kDa) y HT-F4 (MW < 3 kDa), además de los digeridos HTD y VTD con sus respectivas fracciones HTD-23, HTD-28, VTD-28 y VTD-31, utilizando un sistema de monocapas de células Caco-2/TC7, evaluando el pasaje y/o modificación de péptidos mediante el análisis cromatográfico de las soluciones apicales y basolaterales.

Previamente a los ensayos de evaluación de la absorción intestinal, se realizó un ensayo de citotoxicidad sobre las células Caco-2/TC7, usando el método de LDH para evaluar la integridad de la membrana y, por lo tanto, cualquier posible efecto citotóxico de las muestras evaluadas. En la Figura 4.34 se muestra el efecto que tuvo las diferentes concentraciones (0,5

– 5 mg/mL) de HT, HTD y VTD sobre la citotoxicidad de las células, encontrando que las tres muestras presentaron efectos dependientes de la concentración sobre la integridad de la membrana de las células. Para el caso de HT, se observa que las concentraciones entre 0,5 y 1 mg/mL no son citotóxicas para las líneas celulares, sin embargo, para HTD y VTD debe emplearse concentraciones inferiores a 0,5 mg/mL. En el caso de las fracciones, los resultados se presentan en la Tabla 4.22, estos muestran que dichas fracciones no fueron citotóxicas en las concentraciones en las que fueron analizadas. Una vez comprobado que las muestras no resultaron citotóxicas, se realizaron los ensayos de absorción intestinal de las muestras en dirección apical – basolateral, incubando las monocapas confluentes de células Caco-2/TC7, donde posteriormente se tomó el contenido de cada una de las cámaras (apical y basolateral), para su análisis cromatográfico junto con la muestra original correspondiente.

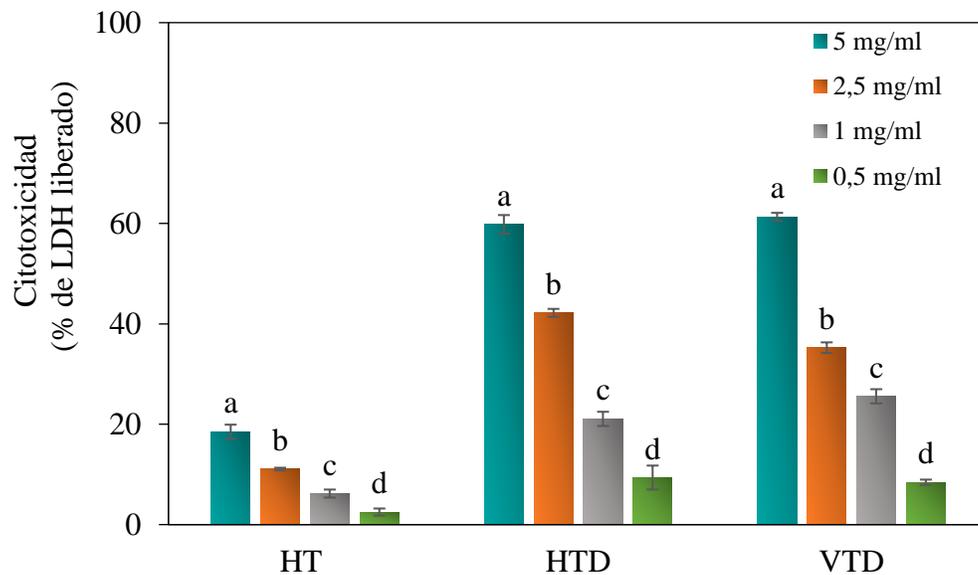


Figura 4.34. Efecto de HT, HTD y VTD sobre la citotoxicidad de las células Caco-2/TC7 según lo evaluado por el ensayo LDH. Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre las concentraciones de la misma muestra ($p < 0,05$).

Tabla 4.22. Efecto de las fracciones sobre la citotoxicidad de las células Caco-2/TC7 según lo evaluado por el ensayo LDH

Fracción	Concentración (mg/mL)	Citotoxicidad (%LDH liberado)
HT-F3	1,00	3,75 ± 0,65
HT-F4	1,00	3,25 ± 0,35
HTD23	0,88	3,75 ± 0,35
HTD28	0,23	3,75 ± 0,35
VTD28	0,13	3,75 ± 0,35
VTD31	0,56	4,25 ± 0,80

4.8.5.1. Simulación de la absorción intestinal de HT y sus fracciones HT-F3 y HT-F4

Se realizó la evaluación de la absorción de HT y sus fracciones obtenidas por ultrafiltración HT-F3 (3 -10 kDa) y HT-F4 (MW < 3 kDa) a través de la monocapa de las células Caco-2/TC7, con el objetivo de evidenciar el posible pasaje de componentes peptídicos y la posible modificación por acción de las células intestinales. Para el ensayo de absorción, las muestras se sembraron a una concentración de 1 mg/mL. Los perfiles peptídicos obtenidos para HT, HT-F3 y HT-F4 y sus contenidos en las cámaras apical y basolateral se presentan en las Figuras 4.35, 4.36 y 4.37, respectivamente.

En la Figura 4.35A se observa que el perfil de HT solo muestra dos picos no muy bien resueltos a tiempos de retención (t_R) entre 3,7 y 5,6 min (moléculas hidrofílicas). Al comparar este perfil con el de la cámara apical (Figura 4.35B) se observa grandes diferencias entre ambos, ya que, si bien en el perfil de la cámara apical también están presentes dos picos al inicio del cromatograma representando moléculas hidrofílicas, estos se encuentran bien resueltos y con t_R menores (0,9 y 3,8 min). Asimismo, se observa la aparición de un nuevo conjunto de picos más pequeños con tiempos de retención entre 4,5 y 14 min, además de dos picos bien definidos con t_R de 20,2 min y 26,5 min, representando las moléculas hidrofóbicas presentes. Indicando lo anterior que hubo modificaciones en al menos algunos de los componentes de HT al estar en contacto con las células intestinales, que podrían estar relacionadas con la acción de las peptidasas del borde en cepillo de la membrana apical. Al

analizar el perfil de la cámara basolateral (Figura 4.35B), se observa que se repiten los mismos picos presentes en la cámara apical, pero con menor intensidad, demostrando esto que algunos de los péptidos y en una cierta proporción lograron atravesar la monocapa celular y alcanzar la cámara basolateral. No obstante, no puede asegurarse que no ocurrieron modificaciones adicionales durante el pasaje sin una identificación de los péptidos presentes en cada cámara.

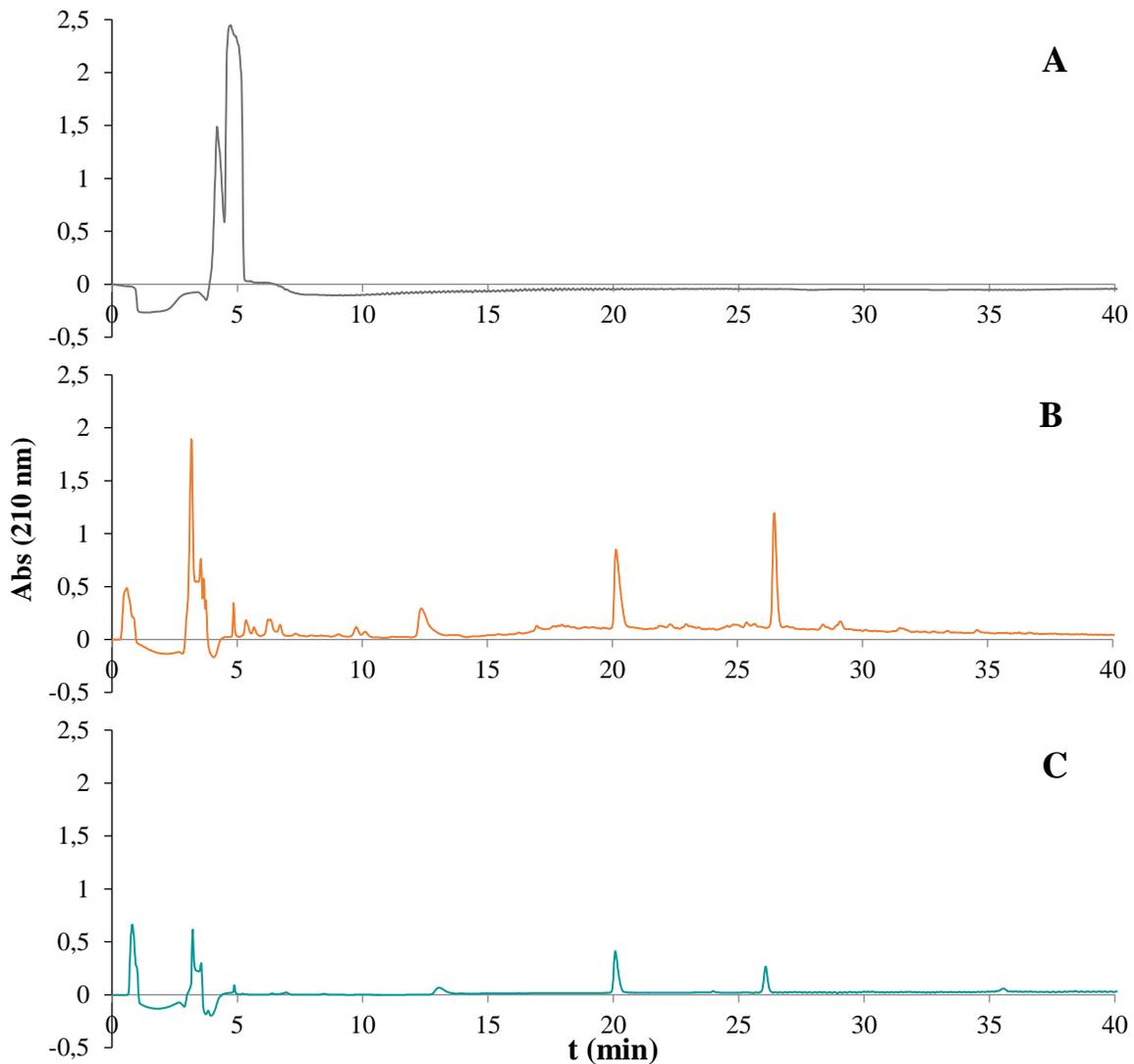


Figura 4.35. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de HT a 1 mg/mL. A. Muestra original. B. Cámara apical. C. Cámara basolateral.

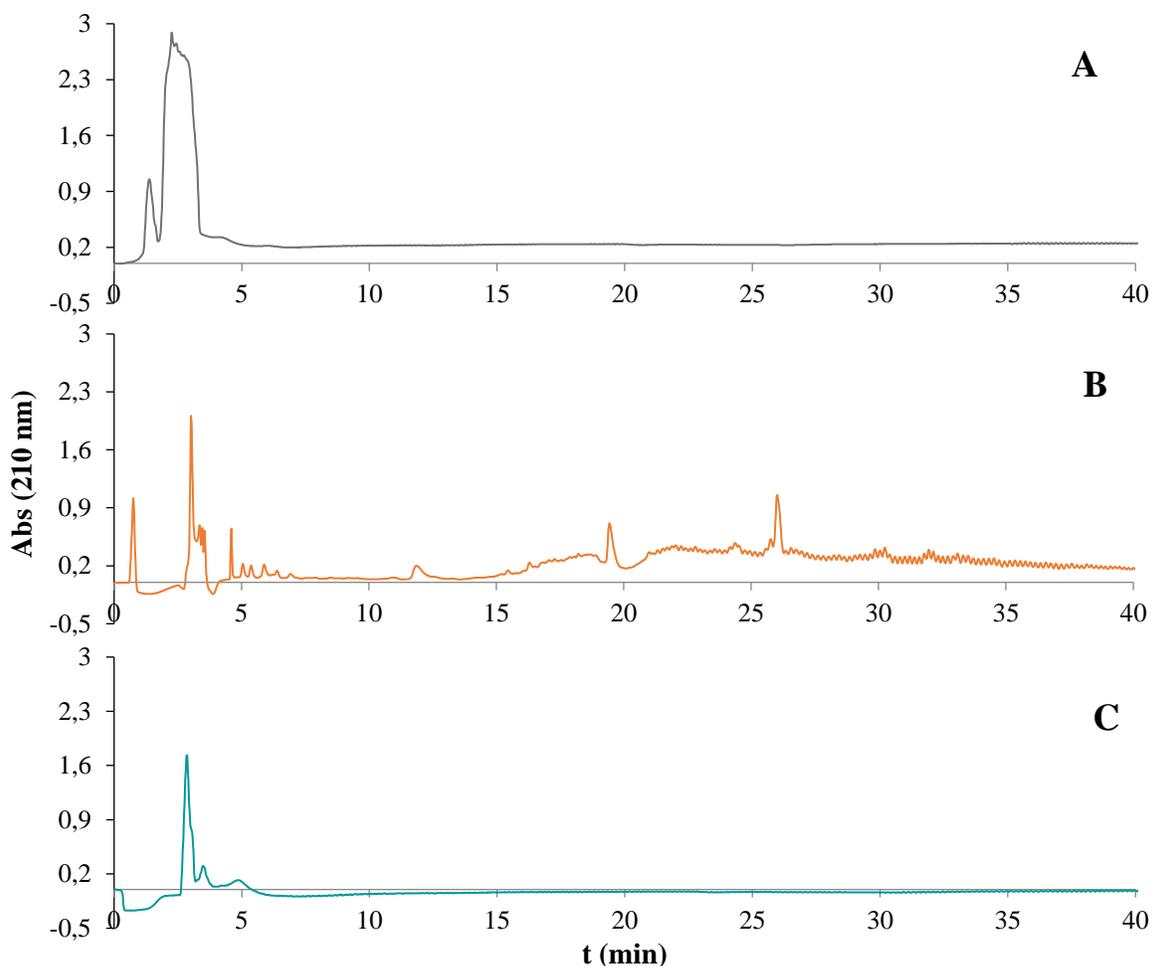
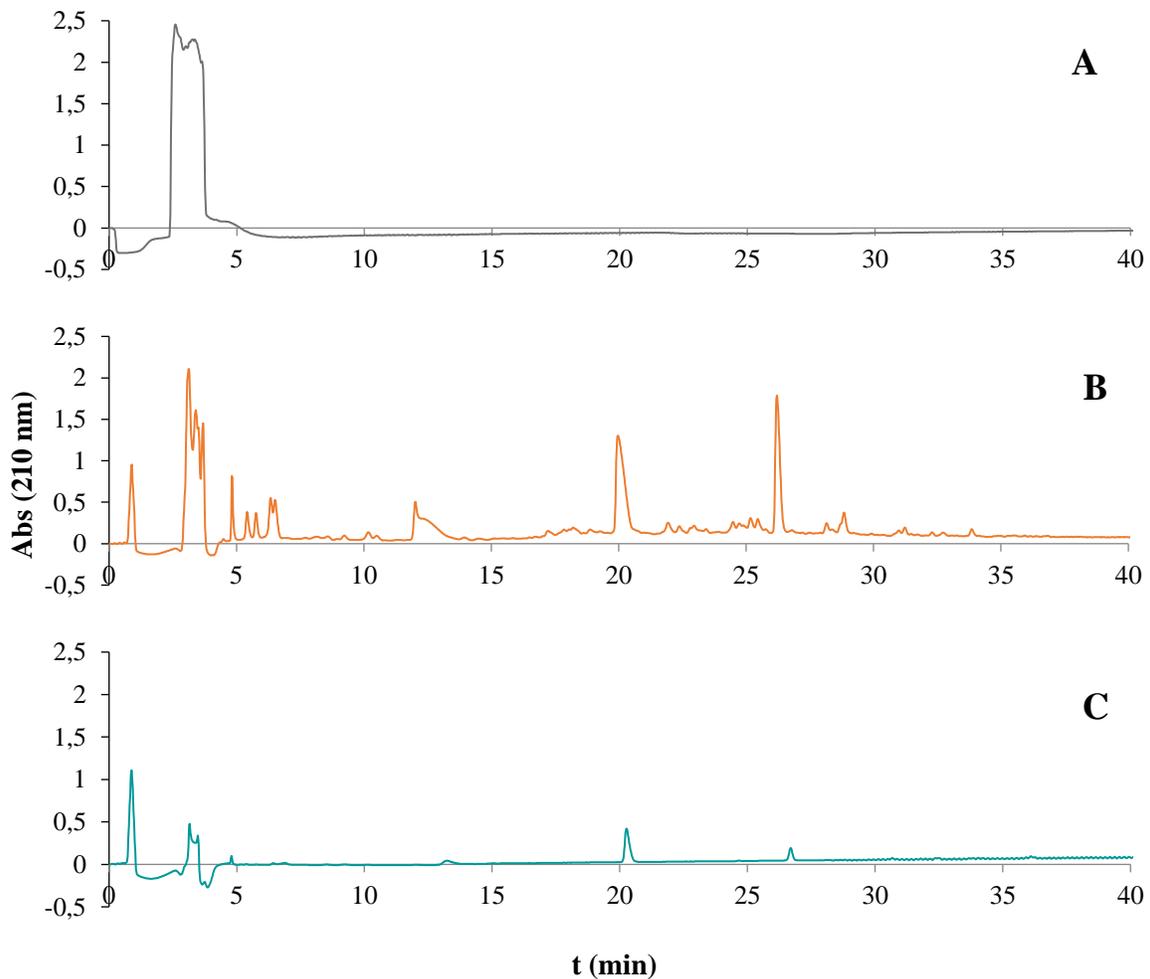


Figura 4.36. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de **HT-F3** a 1 mg/mL. **A.** Muestra original. **B.** Cámara apical. **C.** Cámara basolateral.

En el caso de los perfiles obtenidos para HT-F3 y HT-F4, se observa que similar al perfil de HT, ambos presentan dos picos coeluyendo en t_R menores a 4 min (Figura 4.36A y 4.37A), representando moléculas hidrofílicas. Igualmente, ambas fracciones sufrieron modificaciones en la presencia de las peptidasas del borde en cepillo de la membrana apical, debido a que se observa la aparición de nuevos picos con moléculas de diversas características hidrofílicas/hidrofóbicas (Figura 4.36B y 4.37B). Sin embargo, al analizar el perfil de la cámara basolateral de HT-F3 (Figura 4.36C), solo se observan picos en los t_R menores a 5 min, sin mostrar ningún otro pico en el resto del cromatograma, lo que sugiere que, en el tiempo de ensayo, solo algunos péptidos y en cierta proporción lograron atravesar la membrana celular. Esto puede deberse a que esta fracción contiene polipéptidos con pesos moleculares entre 10 kDa y 3 kDa, que se bien los resultados indican degradación por

peptidasas (Figura 4.36B), podrían aún quedar moléculas grandes que presentan mayor dificultad para ser absorbidas. No obstante, este comportamiento no se observa en el perfil de la cámara basolateral de HT-F4 (Figura 4.37C), donde si se repiten en menor intensidad los mismos picos presentes en la cámara apical (Figura 4.37B), demostrando que varios de los péptidos y en una cierta proporción lograron atravesar la monocapa celular. Algunos autores afirman que, los péptidos de bajo peso molecular se absorben más fácilmente a través de la membrana del trato gastrointestinal que las proteínas y los aminoácidos libres (Abdelhedi & Nasri, 2019; Norris et al., 2014; Xu et al., 2019).



*Figura 4.37. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de **HT-F4** a 1 mg/mL. **A.** Muestra original. **B.** Cámara apical. **C.** Cámara basolateral.*

4.8.5.2. Simulación de la absorción intestinal de HTD y sus fracciones HTD-23 y HTD-28

En cuanto a la evaluación de la absorción intestinal simulada de HTD y sus fracciones HTD-23 (0,70 – 0,89 kDa) y HTD-28 (0,22 – 0,28 kDa) los resultados se muestran en las Figuras 4.38, 4.39 y 4.40, respectivamente.

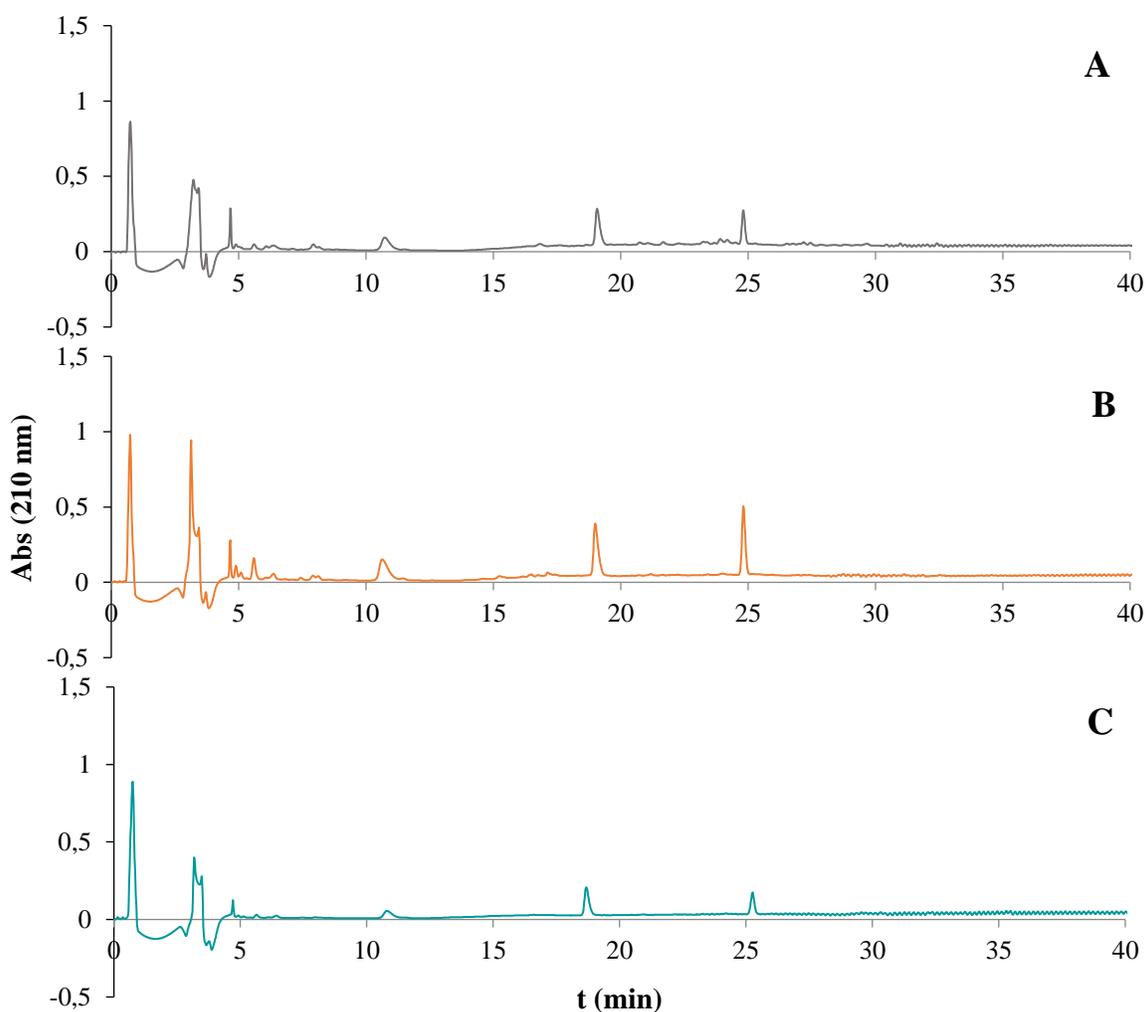
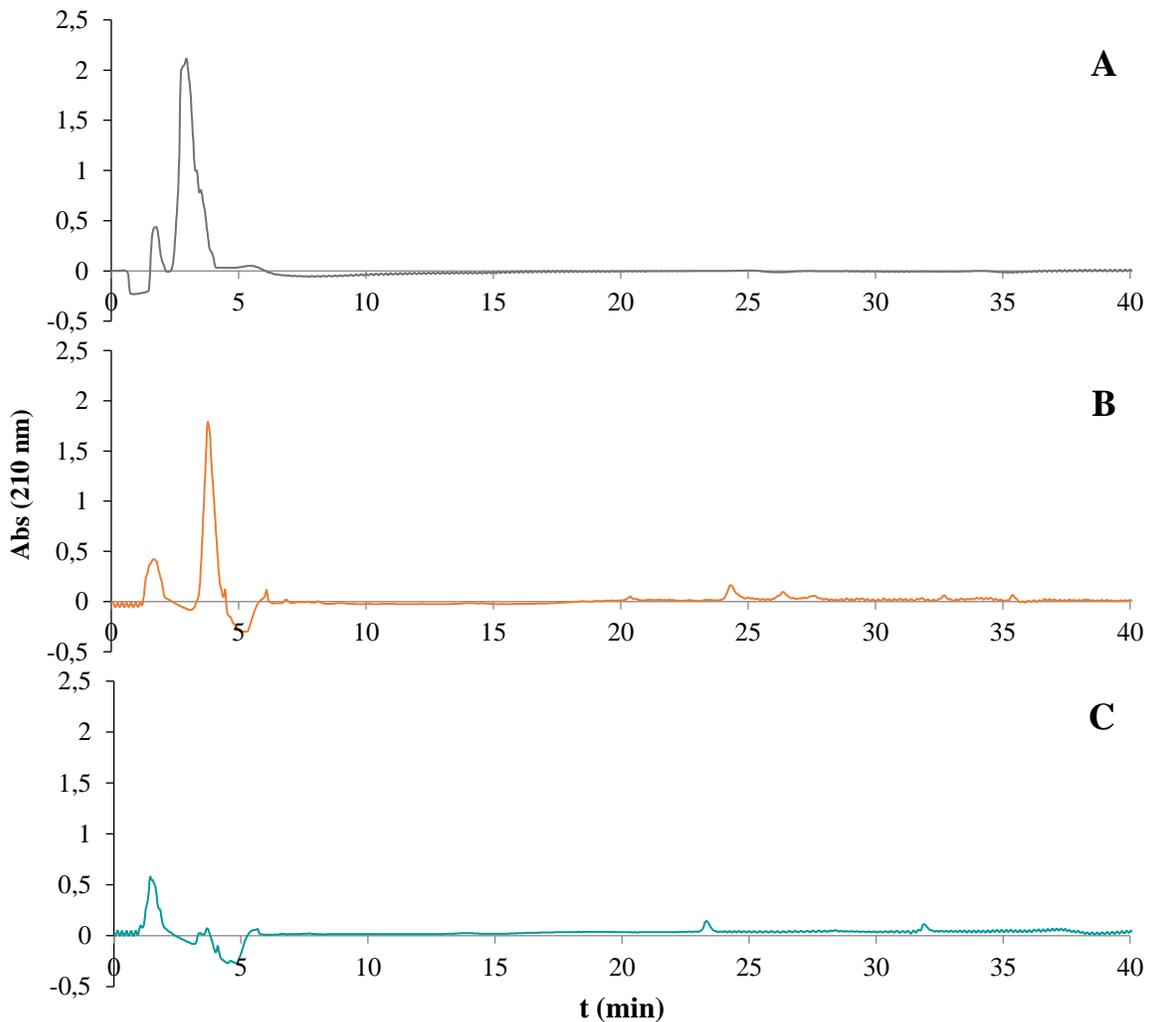


Figura 4.38. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de **HTD** a 0,25 mg/mL. **A.** Muestra original. **B.** Cámara apical. **C.** Cámara basolateral.

En la Figura 4.38A se observa que el perfil para HTD presenta seis picos bien resueltos, los tres primeros representando las moléculas más hidrofílicas con t_R entre 0,74 y 4,6 min, el cuarto pico con un t_R de 10,9 min y los dos últimos (moléculas hidrofóbicas) con t_R entre 19,1 y 24,8 min; además se observa un grupo de picos de menor intensidad entre los tiempos

de retención de 5 y 10 min. Al analizar los resultados obtenidos para la cámara apical (Figura 4.38B) y basolateral (Figura 4.38C), se observa que los perfiles son similares al de HTD, compartiendo el mismo número de picos con sus correspondientes t_R , pero presentando menor intensidad en el perfil de la cámara basolateral. Lo anterior sugiere que para el caso de HTD, sus moléculas de diversas características hidrofílicas/hidrofóbicas (según sus t_R) resistieron la acción de las peptidasas intestinales, además de que parte de estas lograron atravesar la monocapa en una cierta proporción.



*Figura 4.39. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de **HTD-23** a 0,88 mg/mL. A. Muestra original. B. Cámara apical. C. Cámara basolateral.*

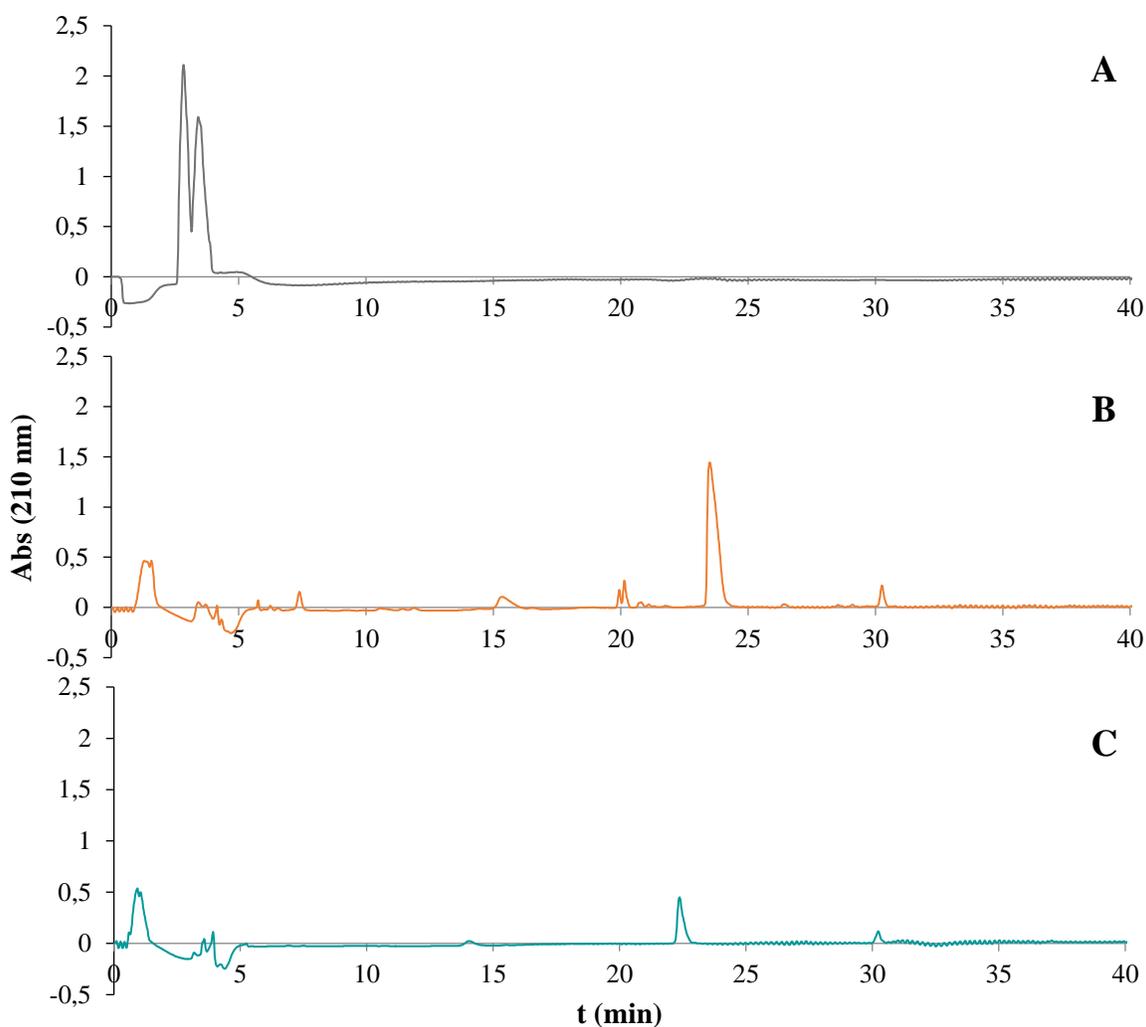


Figura 4.40. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de **HTD-28** a 0,23 mg/mL. **A.** Muestra original. **B.** Cámara apical. **C.** Cámara basolateral.

Con respecto a los perfiles obtenidos para la fracción HTD-23 (Figura 4.39), se observa que la muestra original presenta solo dos picos en t_R menores a 5 min; los cuales se conservan en la cámara apical (Figura 4.39B), sin embargo, en el perfil de dicha cámara se observa la aparición de varios picos pequeños con t_R mayores a 20 min, los cuales se repiten en la cámara basolateral (Figura 4.39C), pero con menor intensidad. Asimismo, se observa en el perfil de la fracción HTD-28 (Figura 4.40A), que dos picos coeluyeron a t_R menores a 5 min, los cuales al parecer sufrieron modificaciones por la acción de las peptidasas de la membrana apical, debido a la aparición de nuevos picos con moléculas de diversas características hidrofílicas/hidrofóbicas (Figura 4.40B), la mayoría de los cuales se repiten en la cámara

basolateral (Figura 4.40C). Estos resultados sugieren que las moléculas inicialmente presentes en ambas fracciones sufrieron la acción de las peptidasas del borde en cepillo, y que una cierta proporción de las moléculas resultantes lograron atravesar la monocapa hacia el compartimento basolateral.

4.8.5.3. Simulación de la absorción intestinal de VTD y sus fracciones VTD-28 y VTD-31

En las Figuras 4.41, 4.42 y 4.43 se muestran los perfiles cromatográficos correspondientes al ensayo de absorción intestinal simulada de VTD y sus fracciones VTD-28 (0,22 – 0,28 kDa) y VTD-31 (0,17 – 0,14 kDa). En la Figura 4.41A se observa que el perfil para VTD presenta seis picos bien definidos, donde los tres primeros se encuentran en t_R menores a 5 min (moléculas más hidrofílicas), seguidos de un cuarto pico con un t_R de 13,5 min, para finalmente encontrar los dos últimos picos (moléculas hidrofóbicas) con t_R entre 20,9 y 27,0 min; asimismo se observa un grupo de picos de menor intensidad entre los tiempos de retención de 5,4 y 11,2 min. Al compararlo con el perfil obtenido para la cámara apical (Figura 4.41B) se observa que los perfiles son idénticos, indicando esto que las moléculas presentes en VTD resistieron la acción de las peptidasas intestinales. No obstante, al analizar el perfil obtenido para la cámara basolateral (Figura 4.41C), se observa que solo una cierta proporción de las moléculas más hidrofílicas fueron capaces de traspasar la monocapa, lo que sugiere que, en el tiempo de ensayo, solo algunos péptidos lograron atravesar la membrana.

En cuanto a los perfiles obtenidos para la fracción VTD-28 (Figura 4.42), se observa que el perfil de la fracción original es similar al de la cámara apical, compartiendo el mismo número de picos con sus correspondientes t_R (Figura 4.42B), además de también estar presentes en menor intensidad en el perfil de la cámara basolateral (Figura 4.42C). Lo anterior sugiere que, para el caso de esta fracción, sus moléculas resistieron la acción de las peptidasas intestinales, además de que algunas consiguieron atravesar la monocapa en una cierta proporción. En el caso de la fracción VTD-31 (Figura 4.43), si se observa que las moléculas presentes sufrieron modificaciones por las peptidasas del borde en cepillo, debido a que se observa cambios en los perfiles cromatográficos (Figura 4.43B), no obstante, se observa que

solo una proporción de las moléculas resultantes lograron atravesar la monocapa hacia el compartimento basolateral (Figura 4.43C).

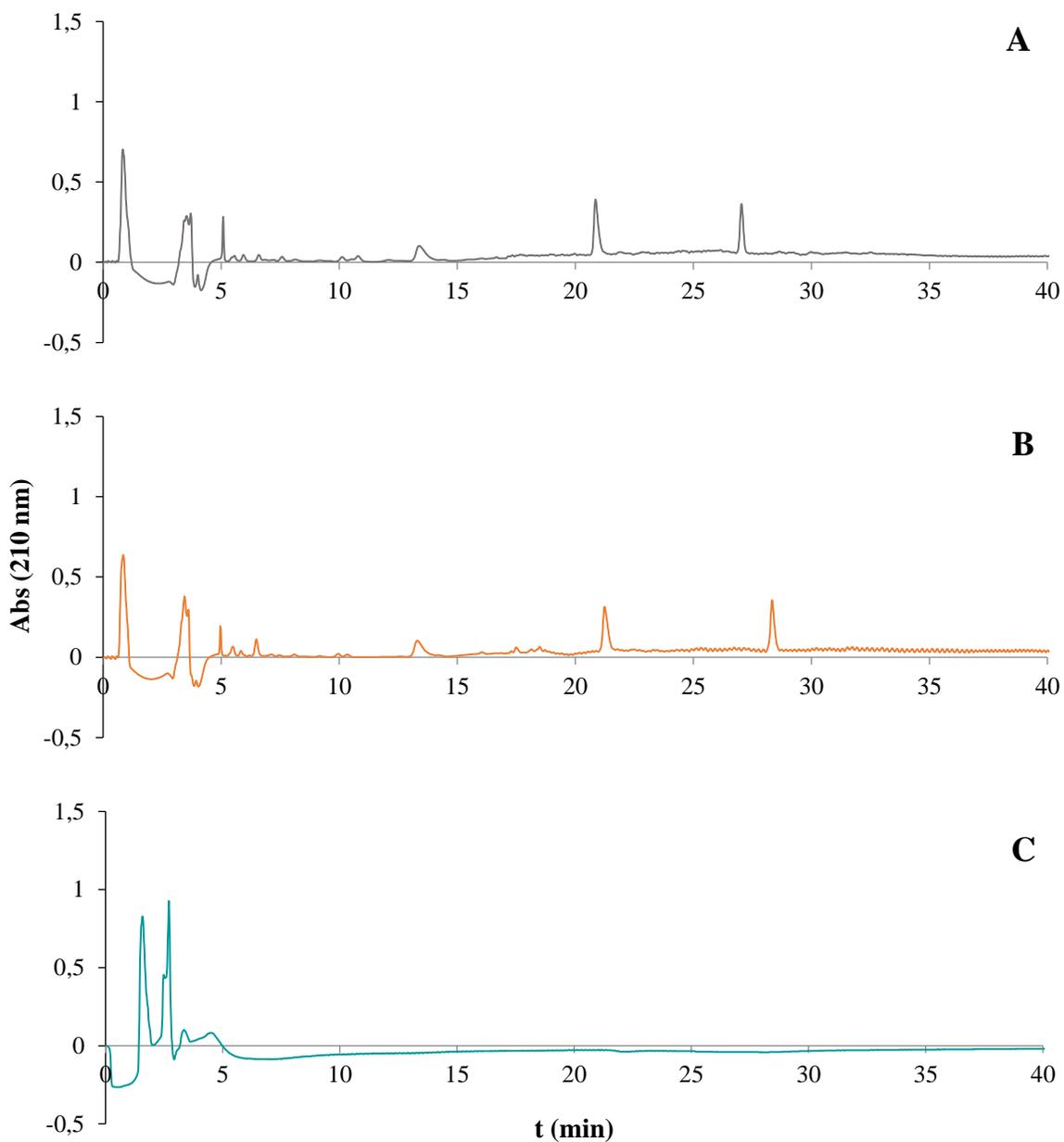


Figura 4.41. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de **VTD** a 0,25 mg/mL. **A.** Muestra original. **B.** Cámara apical. **C.** Cámara basolateral.

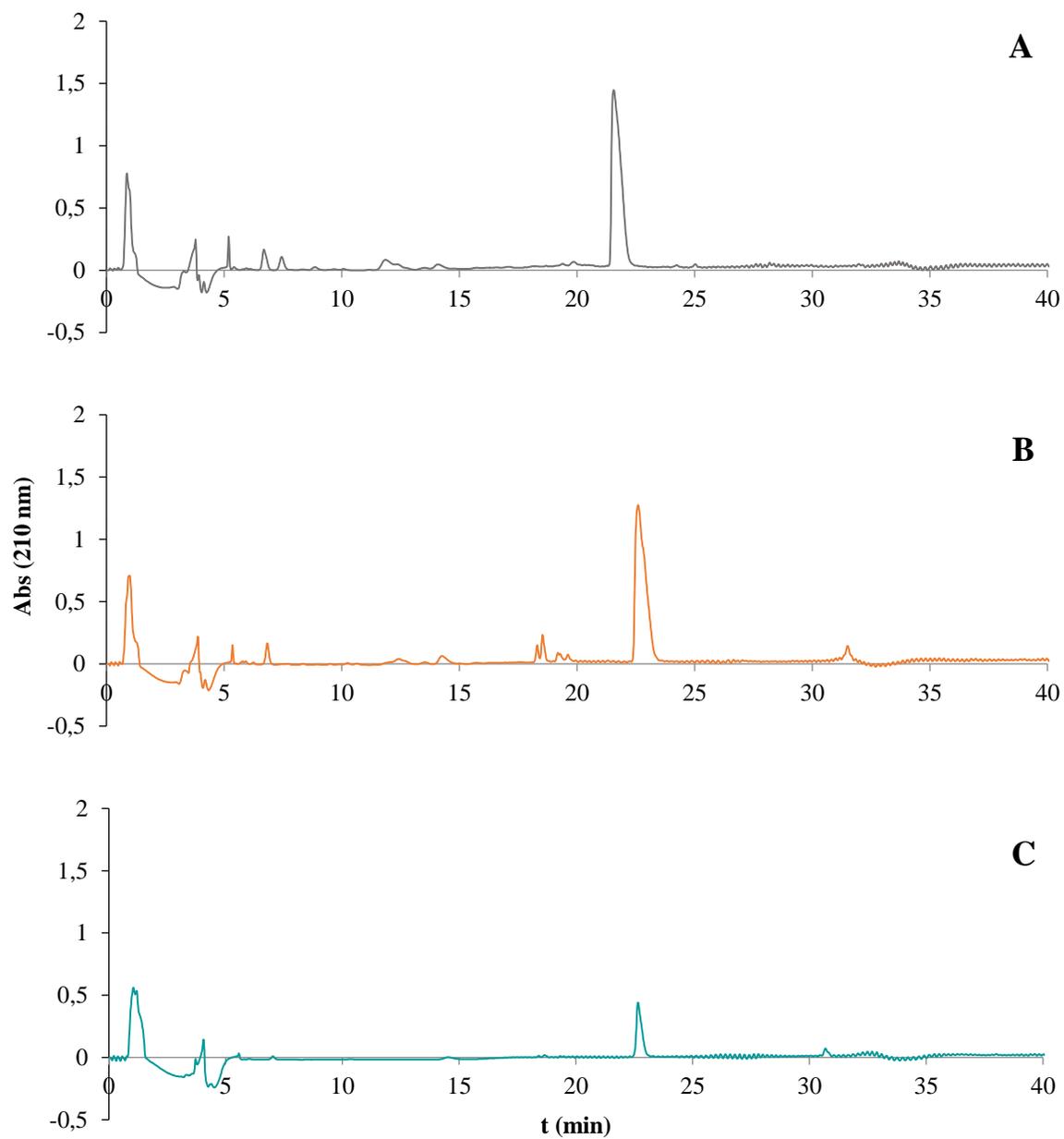


Figura 4.42. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de VTD-28 a 0,13 mg/mL. A. Muestra original. B. Cámara apical. C. Cámara basolateral.

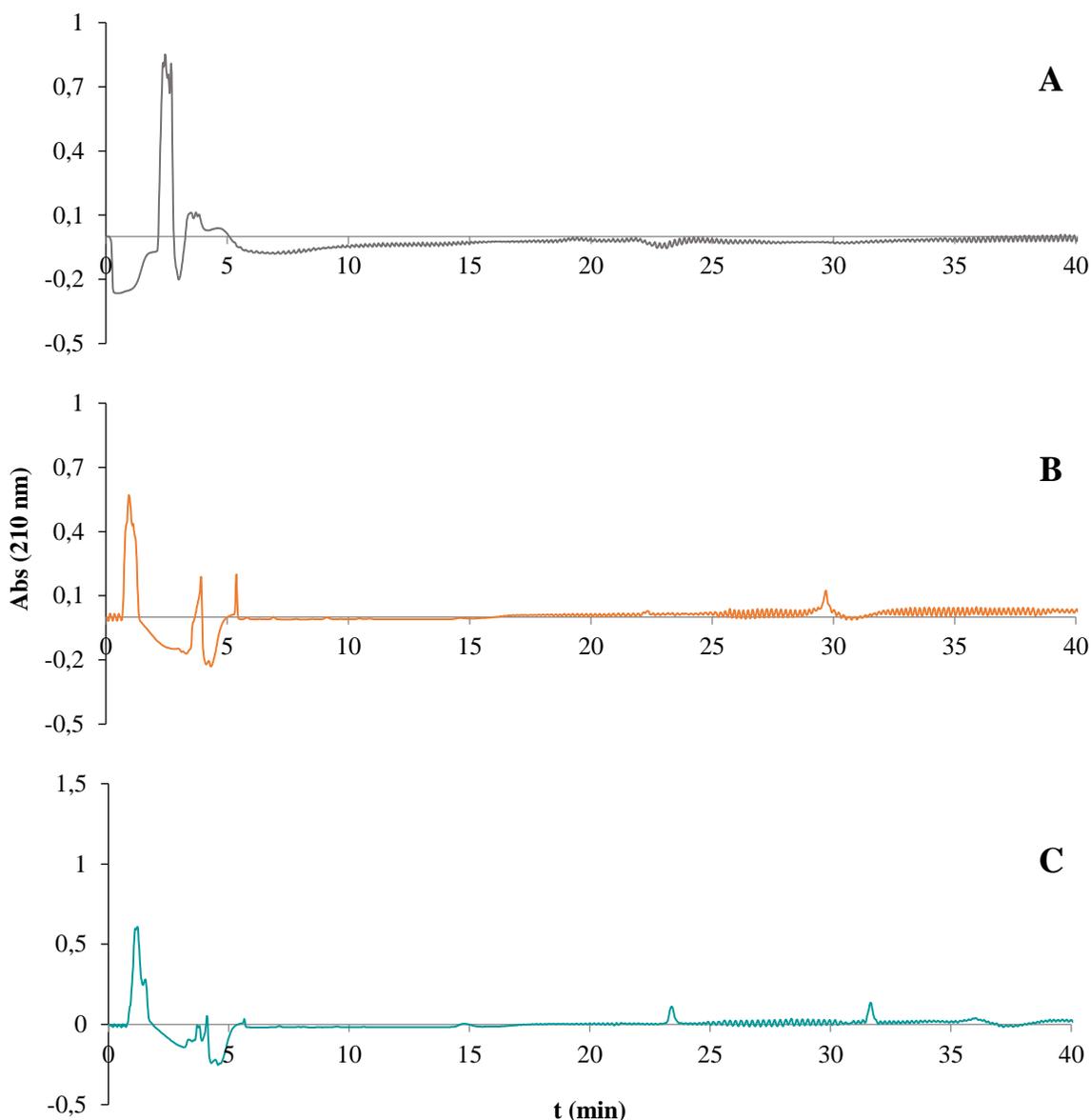


Figura 4.43. Perfiles RP-HPLC correspondientes al ensayo de absorción de **VTD-31** a 0,56 mg/mL. **A.** Muestra original. **B.** Cámara apical. **C.** Cámara basolateral.

Los resultados encontrados para HTD y VTD, muestran que una hidrólisis previa de las vísceras de trucha con Alcalasa® 2.4L mejora la absorción intestinal de los productos de la digestión gastrointestinal simulada, como se evidencio en el comportamiento encontrado para HTD, debido a que fue posible verificar la absorción de ciertos componentes originales presentes en la muestra, mostrando su posible bioaccesibilidad. No obstante, para el caso de HT y sus fracciones, se observó que las moléculas presentes sufren modificaciones adicionales al enfrentarse a la monocapa de células Caco-2/TC7, donde algunas de estas

atravesaron la pared intestinal simulada, demostrando su posible bioaccesibilidad. Todo lo anterior, abre el interrogante acerca de la actividad de las nuevas moléculas, tanto a nivel de la mucosa intestinal como a nivel sistémico para aquellas que logran ser absorbidas. Quedan por realizar a futuro estudios para la identificación y la evaluación de la actividad de los péptidos resultantes de la hidrólisis con las peptidasas.

Algunos estudios realizados sobre la bioaccesibilidad de péptidos bioactivos de subproductos acuícolas, como por ejemplo los realizados por Toopcham, Mes, Wichers, Roytrakul, & Yongsawatdigul (2017), en péptidos con actividad inhibidores de la ECA de los hidrolizados enzimáticos de proteínas del musculo de tilapia (*Oreochromis niloticus*), encontraron que aunque la digestión GI *in vitro* disminuyó la potencia bioactiva del hidrolizado de proteínas, esta logró mejorar la permeabilidad de los péptidos a través de monocapas de células Caco-2. Asimismo, Samaranayaka, Kitts, & Li-Chan (2010), evaluaron la bioaccesibilidad péptidos con actividad antioxidante e IECA de hidrolizados de merluza del Pacífico (*Merluccius productus*), encontrando que los péptidos inhibidores de la ECA no presentaron ningún cambio luego de la digestión GI, sin embargo, encontraron que los péptidos antioxidantes aumentaron su capacidad luego de la digestión y pasaron a través de las células Caco-2. Por su parte, Oliveira et al., (2019) reportaron que después de la digestión GI *in vitro* de los hidrolizados de músculo de corvinata pescadilla (*Cynoscion guatucupa*) con actividades antioxidantes, estos fueron potencialmente bioaccesibles.

4.9. Estudio de las propiedades funcionales de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L (HT)

Recientemente las proteínas de subproductos de pescado han sido evaluadas por sus propiedades funcionales y su posible aplicación como ingredientes en los sistemas alimentarios. Sin embargo, estas propiedades se ven modificadas cuando dichas proteínas son sometidas a hidrólisis enzimática, debido a que se obtienen péptidos solubles, que pueden mejorar la capacidad emulsionante y la capacidad de formación de espuma (Pacheco-Aguilar, Mazorra-Manzano, & Ramirez-Suarez, 2008). No obstante, esta hidrólisis no puede ser muy extensa porque si bien mejora la solubilidad de las proteínas, conlleva a una pérdida de la

calidad anfifílica provocando una disminución en las otras propiedades (Villamil et al., 2017). Teniendo en cuenta lo anterior, se evaluó el efecto que puede tener el GH (0% - 20%) sobre la solubilidad, la capacidad emulsionante y la capacidad espumante de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris, además de la influencia del pH (4 - 10).

4.9.1. Influencia del GH y el pH sobre la solubilidad de las proteínas de los hidrolizados

La solubilidad de los hidrolizados preparados a diferentes grados de hidrólisis y diferentes valores de pH se muestran en la Figura 4.44. El análisis de varianza de dos factores para los valores de solubilidad mostró que existe una interacción significativa ($p < 0,05$) entre el grado de hidrólisis y el valor de pH de las muestras. La solubilidad aumenta significativamente ($p < 0,05$) a medida que incrementa el GH entre 0%, 5% y 10% en todos los valores de pH evaluados. Sin embargo, para pH 4 y 10 los valores de solubilidad en los GH 15% y 20% no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$), lo cual no se observó para pH 7, ya que se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos GH, encontrándose la solubilidad más alta al GH de 20% ($p < 0,05$), con un incremento del 30% con respecto a la proteína sin hidrolizar. Esta correlación positiva entre la solubilidad y el GH, se debe principalmente a que a los péptidos de bajo peso molecular contienen un número mayor de grupos amino y carboxilo ionizables en comparación a la proteína nativa, lo cual hace que aumente la capacidad de formar enlaces de hidrógeno con agua y por lo tanto que incremente la solubilidad de los hidrolizados (Gbogouri, Linder, Fanni, & Parmentier, 2004; Kristinsson & Rasco, 2000a). Resultados similares del comportamiento de la solubilidad a diferentes GH se obtuvieron en estudios realizados en vísceras de atún barrilete (*Katsuwonus pelamis*) (Klomklao & Benjakul, 2018), esqueleto de baga japonesa (*Nemipterus japonicus*) (Gajanan et al., 2016), piel de caballa española (*Scomberomorus niphonius*) (C. F. Chi et al., 2014) y músculo de caballa franja amarilla (*Selaroides leptolepis*) (Klompong et al., 2007).

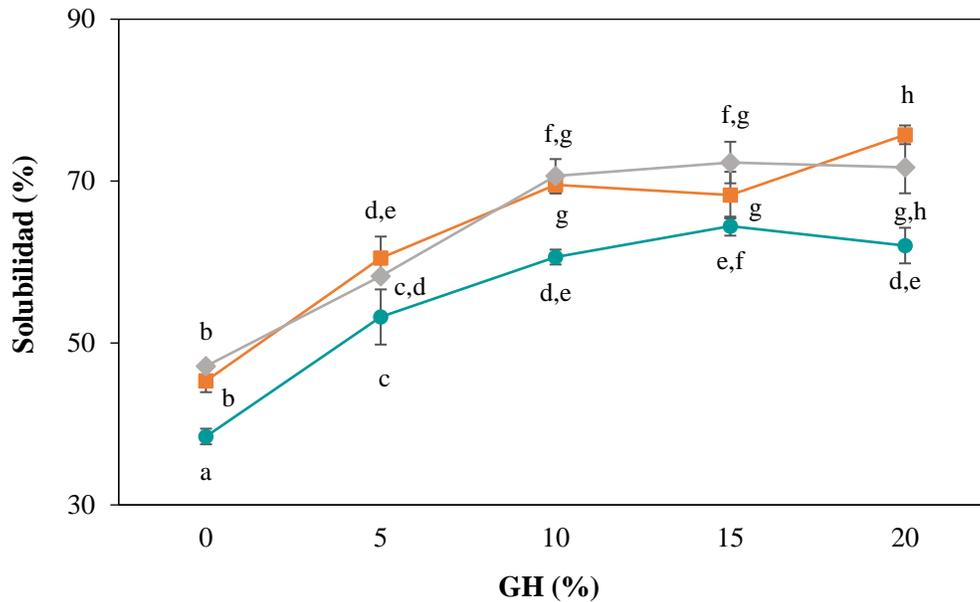


Figura 4.44. Solubilidad de HT en función del GH (%) y a diferentes valores de pH: 4 (●), 7 (■) y 10 (◆). Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la Figura 4.44 se observa que HT a todos los GH muestra la solubilidad más baja a pH 4 ($p < 0,05$), lo cual puede deberse a que algunas proteínas o péptidos de alto peso molecular que no se hidrolizaron, pudieron precipitar a este valor de pH, el cual se encuentra cerca del punto isoeléctrico (pI) de las proteínas de pescado (Kristinsson & Rasco, 2000a; Y. Liu et al., 2014). Además, la disminución de la solubilidad de HT a este valor de pH también puede atribuirse al cambio que puede ocurrir en la carga neta de los péptidos presentes en dichos hidrolizados, que disminuye a medida que el pH se acerca al punto isoeléctrico, impidiendo la interacción hidrofílica entre las proteínas y péptidos con el agua (Haque, Timilsena, & Adhikari, 2016; Khan et al., 2020; Taheri et al., 2013). En general, la solubilidad de los hidrolizados de proteínas de pescado es baja a pH entre 4 y 5 como reportó Sripokar, Benjakul, & Klomklao (2019) para hidrolizados de pez gatillo (*Abalistes stellaris*), Noman et al., (2018) para hidrolizados de esturión chino (*Acipenser sinensis*) y Dong et al. (2008) para hidrolizados de carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*). Por su parte, Nguyen, Jones, Kim, San Martin-Gonzalez, & Liceaga (2017), investigaron la solubilidad de hidrolizados de espinas de trucha arcoíris con Alcalasa® 2.4L, encontrando que la solubilidad

más alta se presentaba a pH 7 a todos los GH, obteniendo valores cercanos al 90%. Lo cual concuerda con los resultados de solubilidad encontrados para HT, ya que la solubilidad significativamente más alta ($p < 0,05$) se presentó a pH de 7 (GH de 20%), no obstante, el valor encontrado fue inferior (75,72%). Sin embargo, este valor es cercano a los reportados por Naqash & Nazeer (2013) para la solubilidad de hidrolizados de músculo de baga japonesa (*Nemipterus japonicus*) con papaína y pepsina, los cuales fueron de 74% y 77%, respectivamente. Los resultados anteriores demuestran que los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con Alcalasa 2.4® L a GH mayores al 15%, poseen una buena solubilidad (> 64%) en los valores de pH evaluados, al encontrarse dentro del rango de valores de solubilidad reportados para hidrolizados de proteína de pescado, los cuales presentan valores desde 43,50% a 99,30% (Halim et al., 2016).

4.9.2. Influencia del GH y el pH sobre las propiedades emulsionantes de los hidrolizados

La influencia del GH y el pH sobre el índice de actividad emulsionante (IAE) e índice de estabilidad de la emulsión (IEE) se muestran en la Figura 4.45 y Figura 4.46. Se observa que ambas propiedades presentaron un incremento con la hidrólisis enzimática en comparación a la proteína intacta, este comportamiento se debe a que los hidrolizados son tensoactivos que promueve las emulsiones de aceite en agua, debido a que poseen tanto grupos funcionales hidrofílicos como hidrófobos (Kristinsson & Rasco, 2000a). Los hidrolizados con GH de 5% a pH 7 y 10 mostraron los valores más altos de propiedades emulsionantes ($p < 0,05$), los cuales presentaron valores de IAE (m^2/g) 7,3 y 4,6 mayores en comparación con la proteína sin hidrolizar, además se duplicó el tiempo de estabilidad de la emulsión (IEE). Sin embargo, en el caso de IAE se observa una disminución significativa ($p < 0,05$) cuando el GH aumenta de 5% a 10%, luego del cual se estabiliza ($p > 0,05$) para pH 7 y 10, sin embargo, para pH 4 el valor de IAE sigue descendiendo hasta el GH de 20% ($p < 0,05$). En cuanto al IEE (min), se observa que para pH 10 hay un descenso significativo ($p < 0,05$) entre GH 5% y 10%, después del cual se mantiene constante. En el caso de pH 7, no se presentaron diferencias significativas entre los GH 5% y 10%, pero los valores disminuyen en los GH 15% y 20%. No obstante, Para pH 4 el valor de IEE más altos ($p < 0,05$) se encontró en GH 5%.

Los mejores resultados de las propiedades emulsionantes encontrados a GH de 5%, puede deberse a que este hidrolizado puede contener una mayor proporción de péptidos de alto peso molecular, y por lo tanto una mayor hidrofobicidad superficial, características que se pierden a GH muy altos. Si bien con altos GH, se obtiene péptidos más pequeños, que son altamente estables y se difunden rápidamente para adsorberse en la interfaz, no son lo suficientemente anfifílicos, por lo que son menos eficientes para reducir la tensión interfacial, ya que no pueden desplegarse y ni reorientarse en la interfaz, como si lo hacen las polipéptidos con mayor peso molecular (Halim et al., 2016; Karami & Akbari-Adergani, 2019; Kristinsson & Rasco, 2000a). Varias investigaciones realizadas en hidrolizados de subproductos de pescado encontraron una tendencia similar de las propiedades emulsionantes, en cuanto a su disminución al incrementar el GH. Como se reporta en los estudios realizados en hidrolizados de huevas de atún (*Katsuwonus pelamis*) con Alcalasa® 2.4L por Intarasirisawat, Benjakul, Visessanguan, & Wu (2012) e hidrolizados músculo de esturión chino (*Acipenser sinensis*) con Alcalasa® 2.4L por Noman et al. (2019).

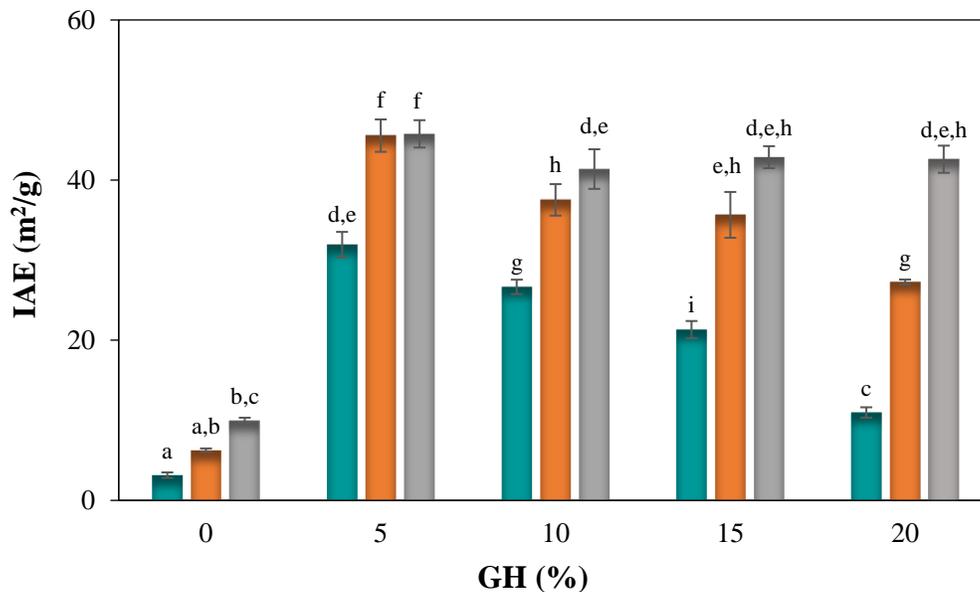


Figura 4.45. Índice de actividad emulsionante (IAE) de HT en función del GH (%) y a diferentes valores de pH: 4 (—), 7 (—) y 10 (—). Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

El análisis de varianza mostro que el pH ejerce un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) sobre la propiedad emulsionante, encontrándose que los valores más bajos para IAE se presentaron a pH 4 en todos los GH. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre pH 7 y pH 10 para GH 5% ($p > 0,05$), donde se encontraron los valores más altos para dicha propiedad, con un IAE de $45,56 \pm 2,02$ m²/g de proteína y un IEE de $40,84 \pm 3,80$ min. Lo anterior, puede deberse a que en esta región de pH (7 - 10) se presenta un despliegue de las proteínas o péptidos, y por lo tanto hay una mayor exposición tanto de los grupos hidrófobos como hidrofílicos, facilitando las emulsiones aceite en agua (Halim et al., 2016). Estas características favorecen las posibilidades de uso de este tipo de hidrolizados en alimentos neutros, pero limitan su aplicación en alimentos ácidos.

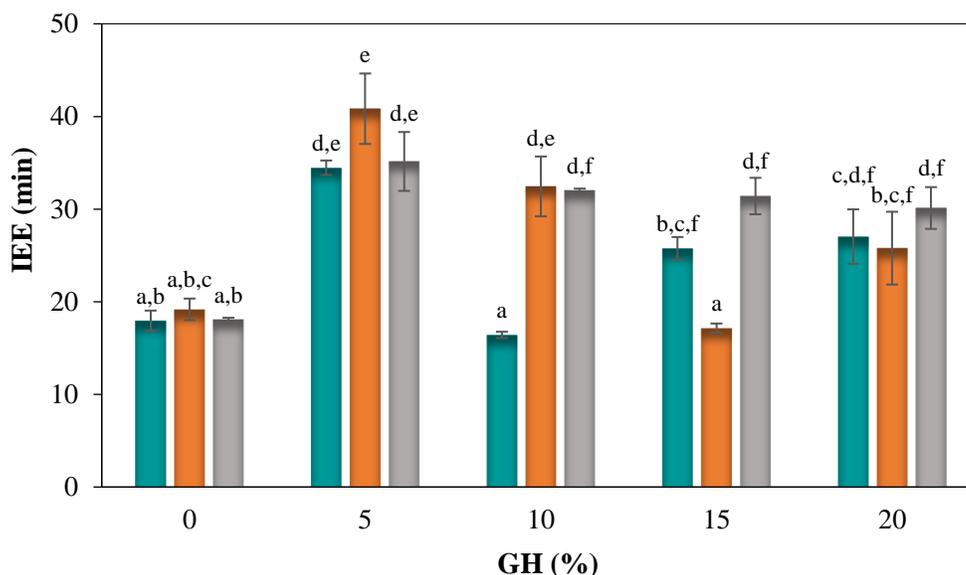


Figura 4.46. Índice de estabilidad de la emulsión (IEE) de HT en función del GH (%) y a diferentes valores de pH: 4 (—), 7 (—) y 10 (—). Las barras representan la desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

Estos valores encontrados para las propiedades emulsionantes de HT son más altos a los reportados por Noman et al. (2018), los cuales obtuvieron valores de IAE y IEE de $13,3$ m²/g y 10 min, respectivamente, para hidrolizados de músculo de esturión chino (*Acipenser sinensis*) a un pH de 6. Asimismo, Sripokar, Benjakul, & Klomklao (2019) reportaron valores para IAE de 25 m²/g con una estabilidad de la emulsión (IEE) de 14 min para hidrolizados de músculo de pez gatillo (*Abalistes stellaris*) con tripsina. No obstante, los valores de IAE

y IEE para HT fueron cercanos a los encontrados por Klomklao & Benjakul (2018) para hidrolizados de vísceras de atún barrilete (*Katsuwonus pelamis*) con Alcalasa® 2.4L, los cuales fueron de $37,95 \pm 1,01 \text{ m}^2/\text{g}$ y $35,29 \pm 1,02 \text{ min}$, respectivamente.

4.9.3. Influencia del GH y el pH sobre las propiedades espumantes de los hidrolizados

Los resultados del ANOVA de dos factores para las propiedades espumantes indican que existe una interacción significativa ($p < 0,05$) entre el grado de hidrólisis y el valor de pH. Asimismo, los valores de la capacidad espumante (CE) y la estabilidad de la espuma (EE) de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris a diferentes GH y valores de pH se muestra en la Figura 4.47 y Figura 4.48. Para el caso de CE (%), se observa que el valor más bajo se obtuvo con la proteína no hidrolizada (GH 0%) a los diferentes valores de pH analizados ($p > 0,05$), con excepción de HT a GH de 20% y pH 4, con el cual no presentó diferencias significativas ($p < 0,05$). Además, se encontró que, para todo el rango de pH evaluado, los valores más alto para la capacidad espumante se presentaron a un GH de 5% ($p < 0,05$) con un rango de $106,7 \pm 8,3\%$ a $168,0 \pm 8,0\%$, luego del cual descienden a medida que GH aumenta, mostrando una correlación negativa con respecto al GH. En cuanto a los valores de EE, en la Figura 4.48 se puede observar que para pH 4 y 7, el valor más alto se obtiene al GH de 5% ($p < 0,05$) sin embargo los valores descienden al continuar incrementando el GH. No obstante, para el caso de pH 10, no se encuentran diferencias significativas entre los valores de EE ($p > 0,05$) para los GH 5% y 15% siendo los valores más altos para este pH.

Este comportamiento encontrado para HT puede deberse a que la formación de espuma se rige por tres factores, como son el transporte, la penetración y la reorganización de las moléculas en la interfaz aire-agua, y por lo tanto para que una proteína o un péptido exhiba buenas propiedades espumantes, debe ser capaz de migrar rápidamente a la interfaz aire-agua, desplegándose y reorganizándose. Sin embargo, los péptidos más pequeños que se presentarían a los GH más altos no tienen la resistencia necesaria para formar una película viscoelástica más fuerte alrededor de las burbujas de aire, como si lo hacen los péptidos más grandes (Karami & Akbari-Adergani, 2019; Wouters, Rombouts, Fierens, Brijs, & Delcour, 2016). Algunos autores concuerdan con la influencia que ejerce el GH sobre las propiedades espumante, como por ejemplo los resultados reportados por Pacheco-Aguilar, Mazorra-

Manzano, & Ramirez-Suarez (2008) para hidrolizados de músculo de merluza del pacífico (*Merluccius productus*) con Alcalasa® 0.6L, y por Gajanan et al. (2016) para hidrolizados de espinas de baga japonesa (*N. japonicus*) usando papaína y bromelina.

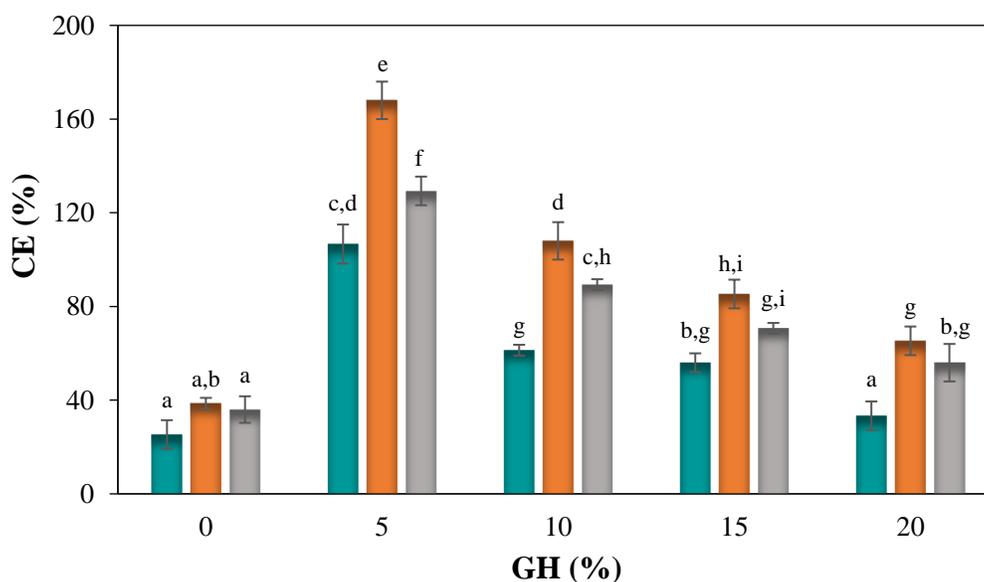


Figura 4.47. Capacidad Espumante (CE) de HT en función del GH (%) y a diferentes valores de pH: 4 (—), 7 (—) y 10 (—). Las barras representan la desviación estándar.

Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

De igual manera, el análisis de varianza mostró que el valor de pH presenta un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la propiedad espumante de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris. Tanto para la capacidad espumante, como para la estabilidad de la espuma, los valores más bajo se encontraron a pH 4 ($p < 0,05$), lo cual coincidió con los resultados encontrados para solubilidad y propiedad emulsionante, y esto puede deberse a la cercanía con el punto isoeléctrico de dichas proteínas, lo cual ocasiona que la su carga neta disminuya y por lo tanto su adsorción en la interfaz aire – agua (Halim et al., 2016; Karami & Akbari-Adergani, 2019). Asimismo, se encontró que tanto para CE como para EE el valor más alto se presentó a GH 5% y pH 7, los cuales fueron de $168,0 \pm 8,0\%$ y $86,7 \pm 6,3\%$, respectivamente. Estos valores para HT son superiores a los reportados por Tejpal et al. (2017) para hidrolizados de subproductos (cabeza, piel, escamas y vísceras) de tilapia (*Oreochromis niloticus*) con pepsina, los cuales fueron de 94,61% para CE y de 60,79% EE. Sin embargo, fueron inferiores a los reportados por Taheri et al. (2013) para vísceras de

trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa® 2.4L, los cuales encontraron valores más altos para CE y EE de 250% y 100%, respectivamente a un pH de 6. No obstante, los resultados obtenidos en cuanto a las propiedades espumantes de HT a GH de 5%, lo hace una matriz interesante con potencial uso en sistemas alimentarios.

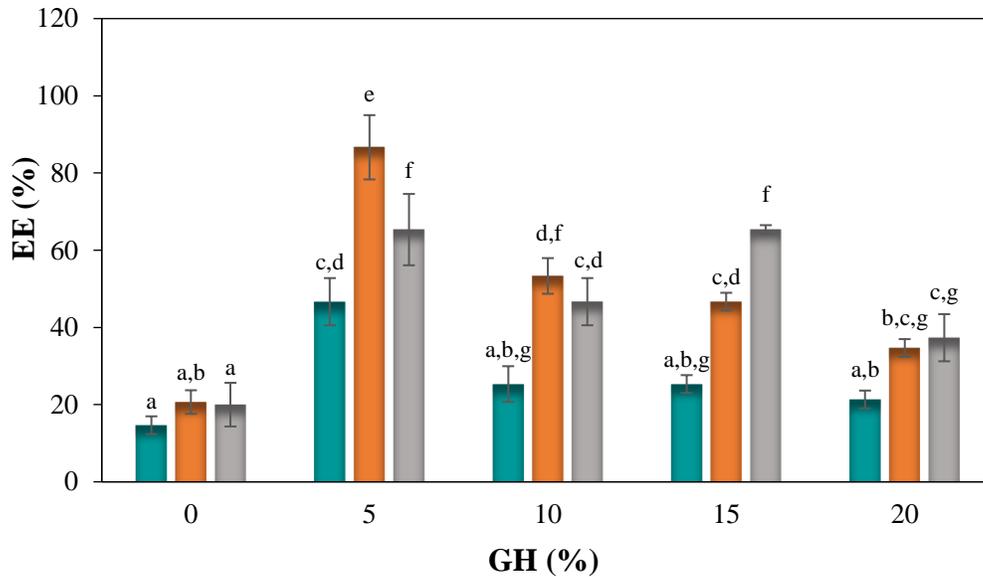


Figura 4.48. Estabilidad de la espuma (EE) de HT en función del GH (%) y a diferentes valores de pH: 4 (—), 7 (—) y 10 (—). Las barras representan la desviación estándar.

Diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

5. CONCLUSIONES

Este estudio permite aportar información cuantitativa y cualitativa valiosa acerca de la hidrólisis enzimática de proteínas de subproductos de pescado. En particular se puede afirmar que:

El pH y la temperatura influyen significativamente sobre la actividad enzimática de Alcalasa® 2.4L en la reacción de hidrólisis de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Donde las condiciones de operación óptimas para maximizar la actividad proteolítica son pH de 8,5 y temperatura de 60 °C.

El grado de hidrólisis de las vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa® 2.4L, es afectado de manera significativa por la concentración de sustrato, la concentración de enzima, la concentración de grasa y velocidad de agitación. Sin embargo, al superar ciertos valores de concentración de sustrato y de velocidad de agitación, estos pueden inhibir la actividad de la enzima en la reacción de hidrólisis.

Las condiciones de operación óptimas que maximizan el GH después de 6 horas de hidrólisis de las proteínas de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa® 2.4L son: concentración de sustrato de 5,45% (m/v), concentración de enzima de 0,72 UA/g de proteína, concentración de grasa de 5,09% (m/m) y velocidad de agitación 102 rpm, a una temperatura y un pH de 8,5 y 60 °C, respectivamente. Obteniéndose con estas condiciones un GH de $20,48 \pm 1,07\%$.

La cinética de la hidrólisis de las proteínas de las vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa® 2.4L no sigue un único mecanismo de reacción, ya que esto va a depender de las condiciones de operación, más específicamente de la concentración de sustrato. Debido a que, a bajas concentraciones de sustrato, la cinética sigue un comportamiento Michaelis-Menten simple, pero que por encima de una concentración crítica de sustrato esta sigue un mecanismo de inhibición por sustrato.

Los hidrolizados generados a partir de la hidrólisis enzimática de las proteínas de las vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa® 2.4L poseen propiedades bioactivas, como capacidad antioxidante e inhibidora de la ECA, pero no capacidad

anticoagulante. Demostrando esto que la hidrólisis enzimática es un método efectivo para la obtención de péptidos bioactivos.

El incremento de GH mejora las actividades antioxidante e inhibidora de la ECA de los hidrolizados de las vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*).

El peso molecular de los péptidos afecta la actividad antioxidante e inhibidora de la ECA de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), encontrándose que las mayores actividades se presentan en la fracción menor a 3 kDa (HT-F4).

El proceso de ultrafiltración en serie de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa® 2.4L, genera un aumento en la concentración de los dipéptidos antioxidantes anserina y carnosina, encontrándose los valores más altos en la fracción HT-F4.

La digestión GI *in vitro* no altera la capacidad de secuestro de radicales ROO• e inhibición de la ECA de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), sin embargo, ocasiona un aumento en las capacidades de inhibición de radicales •OH, secuestro de radicales ABTS y reducción del complejo férrico (FRAP) de dichos hidrolizados.

El proceso de digestión GI *in vitro* de las vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) genera péptidos con actividad antioxidante e inhibidora de la ECA, indicando que esta metodología libera péptidos bioactivos que están encriptados en la proteína nativas.

Parte de los péptidos bioactivos presentes en los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa® 2.4L lograron atravesar en cierta proporción la monocapa de células Caco-2/TC7, que simula la pared intestinal.

El proceso de hidrólisis de las vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa® 2.4L previo a una digestión GI simulada, puede mejorar la bioactividad y posible bioaccesibilidad de las proteínas contenidas en VT, debido a que se liberan nuevos péptidos con efectos biológicos más fuertes y con potencial absorción intestinal.

El proceso de hidrólisis enzimática mejora las propiedades funcionales como solubilidad, capacidad emulsionante, estabilidad de la emulsión, capacidad espumante y estabilidad de la espuma de las proteínas contenidas en VT.

El GH y el pH influyen significativamente sobre las propiedades funcionales de las proteínas de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Donde los valores más bajos se presentan a pH 4. Asimismo, los valores más altos para las propiedades emulsionantes y espumantes se dan a GH bajos (5%), contrario a la propiedad solubilidad, donde sus mayores valores se presentan a GH altos (20%).

Los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con Alcalasa® 2.4L representan una fuente económica y segura, en cuanto a su carga microbiológica y contenido de metales, con potencial de ser ampliamente utilizados como ingredientes en alimentos nutracéuticos o en productos farmacéuticos de uso terapéutico, gracias a sus propiedades bioactivas y funcionales.

6. RECOMENDACIONES

Con la presente investigación se abren diversas oportunidades para profundizar en las características y aplicaciones de los hidrolizados enzimáticos de proteínas de vísceras de trucha arcoíris, las cuales pueden incentivar futuras investigaciones, como, por ejemplo:

Continuar con la evaluación de otras actividades biológicas, tales como: antimicrobianas, anticancerígenas, antienvjecimiento, etc. Para completar las importantes características de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris.

Profundizar en el estudio de las actividades antioxidante y antihipertensiva de los péptidos presentes en HT-F4 (menores a 3 kDa), evaluando su acción sobre distintos sistemas *ex vivo* y cultivos celulares.

Identificar las secuencias de los péptidos presentes en HT-F4 asociado con las mayores actividades antioxidante e inhibidora de la ECA. Asimismo, evaluar las bioactividades y la bioaccesibilidad que presenta cada uno de estos péptidos, con el fin de determinar si estos actúan mejor de forma aislada o sinérgicamente en la mezcla.

Investigar los posibles mecanismos de acción de los péptidos que muestran alta actividad antioxidante e inhibidora de la ECA, para determinar la relación estructura-actividad de estos péptidos.

Identificar los nuevos péptidos generados a partir de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris por acción de las peptidasas del borde en cepillo, tanto a nivel de la mucosa intestinal como a nivel sistémico para aquellas que logran ser absorbidas, y evaluar su bioactividad.

Realizar estudios *in vivo* para determinar los efectos, la biodisponibilidad, las concentraciones plasmáticas óptimas y la farmacocinética de los péptidos menores a 3 kDa de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris con actividades antioxidantes y antihipertensivas.

Estudiar el uso de los hidrolizados de vísceras de trucha arcoíris como ingredientes en alimentos nutraceuticos o en productos farmacéuticos, evaluando requisitos como: seguridad

de consumo, sabor, biodisponibilidad y estabilidad. Asimismo, estudiar la implementación de métodos como la microencapsulación con el objetivo de reducir el sabor amargo que pueden tener los hidrolizados enzimáticos, así como mejorar su estabilidad y absorción.

Implementar un sistema de reactor de hidrólisis enzimática acoplado a membranas de ultrafiltración para producción en continuo, como método más eficiente y económico para la producción de péptidos bioactivos a partir de las proteínas de vísceras de trucha arcoíris.

7. REFERENCIAS

- Abdelhedi, O., & Nasri, M. (2019). Basic and recent advances in marine antihypertensive peptides: Production, structure-activity relationship and bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 543–557. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.002>
- Abdelhedi, O., Nasri, R., Jridi, M., Mora, L., Oseguera-Toledo, M. E., Aristoy, M.-C., ... Nasri, M. (2017). In silico analysis and antihypertensive effect of ACE-inhibitory peptides from smooth-hound viscera protein hydrolysate: Enzyme-peptide interaction study using molecular docking simulation. *Process Biochemistry*, 58, 145–159. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.032>
- Abejón, R., Belleville, M. P., Sanchez-Marcano, J., Garea, A., & Irabien, A. (2018). Optimal design of industrial scale continuous process for fractionation by membrane technologies of protein hydrolysate derived from fish wastes. *Separation and Purification Technology*, 197, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.12.057>
- Abuine, R., Rathnayake, A. U., & Byun, H.-G. (2019). Biological activity of peptides purified from fish skin hydrolysates. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s41240-019-0125-4>
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256–1262.
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Agyei, D., Ongkudon, C. M., Wei, C. Y., Chan, A. S., & Danquah, M. K. (2016). Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioprocess Processing*, 98, 244–256. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.02.003>
- Ahmed, R., & Chun, B.-S. (2018). Subcritical water hydrolysis for the production of bioactive peptides from tuna skin collagen. *The Journal of Supercritical Fluids*, 141, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.006>
- Ahn, C. B., Kim, J. G., & Je, J. Y. (2014). Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. *Food Chem*, 147, 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.136>
- Aissaoui, N., Chobert, J. M., Haertle, T., Marzouki, M. N., & Abidi, F. (2017). Purification and Biochemical Characterization of a Neutral Serine Protease from *Trichoderma harzianum*. Use in Antibacterial Peptide Production from a Fish By-Product Hydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol*, 182(2), 831–845. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2365-4>
- Aluko, R. E. (2018). Food protein-derived peptides: Production, isolation, and purification. In R. Y. Yada (Ed.), *Proteins in Food Processing* (2nd ed., pp. 389–412). United Kingdom: Woodhead Publishing.
- Alvares, T. S., Conte-Junior, C. A., Pierucci, A. P., de Oliveira, G. V., & Cordeiro, E. M. (2018). Acute effect of fish protein hydrolysate supplementation on vascular function in healthy individuals. *Journal of Functional Foods*, 46, 250–255.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.066>

- Ananey-Obiri, D., Matthews, L. G., & Tahergorabi, R. (2019). Proteins From Fish Processing By-Products. In C. M. Galanakis (Ed.), *Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications* (pp. 163–191). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816695-6.00006-4>
- Anson, M. L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology*, 22(1), 79–89. Retrieved from <http://jgp.rupress.org/content/jgp/22/1/79.full.pdf>
- AOAC. (2000). Official methods of analysis. 17th Edn. Washington, DC.: Association Official Analytical Chemists.
- Apar, D. K., & Özbek, B. (2009). A Kinetic Study on Corn Gluten Hydrolysis. *Chemical Engineering & Technology*, 32(4), 673–675. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800468>
- Arshad, N., Siow, H. L., Ngoh, Y. Y., Sofian, N. A. H. S., & Gan, C. Y. (2019). Enzyme and Bioactive Peptides—A Strategy for Discovery and Identification of Antihypertensive Peptides. In M. Kuddus (Ed.), *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 343–367). Academic Press.
- Arvanitoyannis, I. S., & Tserkezou, P. (2014). Fish Waste Management. In I. S. Boziaris (Ed.), *Seafood Processing: Technology, Quality and Safety* (pp. 263–309). London: John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118346174.ch11>
- Aryee, A. N. A., Agyei, D., & Udenigwe, C. C. (2018). Impact of processing on the chemistry and functionality of food proteins. In R. Y. Yada (Ed.), *Proteins in Food Processing* (2nd ed., pp. 27–45). United Kingdom: Woodhead Publishing.
- Aspevik, T., Oterhals, A., Ronning, S. B., Altintzoglou, T., Wubshet, S. G., Gildberg, A., ... Lindberg, D. (2017). Valorization of Proteins from Co- and By-Products from the Fish and Meat Industry. *Topics in Current Chemistry*, 375(3), 53. <https://doi.org/10.1007/s41061-017-0143-6>
- Aspevik, T., Thoresen, L., Steinsholm, S., Carlehög, M., & Kousoulaki, K. (2021). Sensory and Chemical Properties of Protein Hydrolysates Based on Mackerel (*Scomber scombrus*) and Salmon (*Salmo salar*) Side Stream Materials. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 00(00), 1–12. <https://doi.org/10.1080/10498850.2020.1868644>
- Balti, R., Bougatef, A., Sila, A., Guillochon, D., Dhulster, P., & Nedjar-Arroume, N. (2015). Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem*, 170, 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.091>
- Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N. M., & Nunes, M. L. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*, 45(1), 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.07.019>

- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína : procesos y aplicaciones Resumen. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227–237.
- Benjakul, S., & Morrissey, M. (1997). Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3423–3430.
- Benjakul, S., Yarnpakdee, S., Senphan, T., Halldorsdottir, S. M., & Kristinsson, H. G. (2014). Fish protein hydrolysates: production, bioactivities, and applications. In H. G. Kristinsson (Ed.), *Antioxidants and Functional Components in Aquatic Foods* (pp. 237–281). London: John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118855102.ch9>
- Bessada, S. M. F., Barreira, J. C. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2019). Pulses and food security: Dietary protein, digestibility, bioactive and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 53–68. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.022>
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., & Lalitha, R. G. (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*, 99(2), 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.015>
- Bhaskar, N., & Mahendrakar, N. S. (2008). Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*): optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease. *Bioresour Technology*, 99(10), 4105–4111. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.006>
- Bordbar, S., Ebrahimpour, A., Zarei, M., Hamid, A. A., & Saari, N. (2018). Alcalase-generated proteolysates of stone fish (*Actinopyga lecanora*) flesh as a new source of antioxidant peptides. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 1541–1559. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1497060>
- Bougatef, A. (2013). Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications – comprehensive review. *Journal of Cleaner Production*, 57, 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.06.005>
- Bougatef, A., Balti, R., Haddar, A., Jellouli, K., Souissi, N., & Nasri, M. (2012). Protein hydrolysates from Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*) heads as influenced by the extent of enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(4), 841–852. <https://doi.org/10.1007/s12257-012-0053-y>
- Bozic Mijovski, M. (2019). Advances in monitoring anticoagulant therapy. In G. S. Makowski (Ed.), *Advances in Clinical Chemistry* (pp. 197–213). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2019.01.005>
- Cai, L., Wu, X., Zhang, Y., Li, X., Ma, S., & Li, J. (2015). Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Journal of Functional Foods*, 16, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.042>
- Capurso, A., & Capurso, C. (2020). Hemostasis and Thrombosis. In R. De Caterina, J. A. Martinez, & M. Kohlmeier (Eds.), *Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics* (pp. 361–369). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804572-5.00049-5>

- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2014). Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(2), 155–171. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12049>
- Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, *135*(4), 3020–3038. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100>
- Charoenphun, N., Youravong, W., & Cheirsilp, B. (2013). Determination of reaction kinetics of hydrolysis of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein for manipulating production of bioactive peptides with antioxidant activity, angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and Ca-binding properties. *International Journal of Food Science and Technology*, *48*(2), 419–428. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03204.x>
- Chi, C.-F., Wang, B., Wang, Y.-M., Zhang, B., & Deng, S.-G. (2015). Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads. *Journal of Functional Foods*, *12*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.027>
- Chi, C. F., Cao, Z. H., Wang, B., Hu, F. Y., Li, Z. R., & Zhang, B. (2014). Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. *Molecules*, *19*(8), 11211–11230. <https://doi.org/10.3390/molecules190811211>
- Choi, Y. J., Hur, S., Choi, B. D., Konno, K., & Park, J. W. (2009). Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. *J Food Sci*, *74*(1), C17-24. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00988.x>
- Chuesiang, P., & Sanguandeeikul, R. (2015). Protein hydrolysate from tilapia frame: antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitor properties. *International Journal of Food Science & Technology*, *50*(6), 1436–1444. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12762>
- COFFMANN, C. W., & GARCIAJ, V. V. (2007). Functional properties and amino acid content of a protein isolate from mung bean flour*. *International Journal of Food Science & Technology*, *12*(5), 473–484. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1977.tb00132.x>
- Copeland, R. A. (2000). *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis* (2nd ed.). New York, United States: John Wiley & Sons, Inc.
- Copeland, R. A. (2013). *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists citation* (2nd ed.). New Jersey, United States: John Wiley & Sons, Inc.
- Da Rocha, M., Alemán, A., Baccan, G. C., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, C., Montero, P., & Prentice, C. (2018). Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antimicrobial

- Effects of Underutilized Fish Protein Hydrolysate. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 27(5), 592–608. <https://doi.org/10.1080/10498850.2018.1461160>
- de Almeida, D. S., Oliveira, G., & Paresqui, M. F. (2018). *A Review of Recent Patents Regarding Antithrombotic Drugs Derived From Natural Products. Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 61). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64183-0.00001-4>
- Dirección de Cadenas Pecuarias-Colombia. (2020). Cadena de la Acuicultura. Bogotá, Colombia: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.
- Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., & Yang, H. (2008). Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107(4), 1485–1493. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.011>
- Elavarasan, K., Shamasundar, B. A., Badii, F., & Howell, N. (2016). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and structural properties of oven- and freeze-dried protein hydrolysate from fresh water fish (*Cirrhinus mrigala*). *Food Chemistry*, 206, 210–216. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.03.047>
- EPA. Method 3051A (SW-846): Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Oils (2007). United States Environmental Protection Agency (EPA).
- Esteban, M. B., Garcia, A. J., Ramos, P., & Marquez, M. C. (2007). Evaluation of fruit-vegetable and fish wastes as alternative feedstuffs in pig diets. *Waste Management*, (27), 193–200.
- FAO. (2005). Cultured Aquatic Species Information Programme: *Oncorhynchus mykiss*. In I. Cowx (Ed.), *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. Rome: FAO.
- FAO. (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Meeting the sustainable development goals*. Rome.
- FAO. (2019). Visión general del sector acuícola nacional (Colombia). In G. Salazar (Ed.), *National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets*. Roma.
- FAO. (2020). *FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2018. FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2018/FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2018/FAO anuario. Estadísticas de pesca y acuicultura 2018*. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb1213t>
- Figuroa, O. A., Zapata, J. É., & Gutiérrez, G. A. (2012). Modelamiento de la Cinética de la Hidrólisis Enzimática de Proteínas del Plasma Bovino. *Revista EIA*, 17, 71–84.
- Figuroa, O. A., Zapata, J. E., & Sánchez, C. P. (2016). Optimización de la Hidrólisis Enzimática de Proteínas de Plasma Bovino. *Información Tecnológica*, 27(2), 39–52. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642016000200006>
- Fiori, L., Solana, M., Tosi, P., Manfrini, M., Strim, C., & Guella, G. (2012). Lipid profiles of oil from trout (*Oncorhynchus mykiss*) heads, spines and viscera: Trout by-products as a possible source of omega-3 lipids? *Food Chemistry*, 134(2), 1088–1095. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.022>

- FitzGerald, R. J., & Meisel, H. (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition*, 84, S33–S37.
- Folin, O., & Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 627–650.
- Friedman, M. (1996). Nutritional Value of Proteins from Different Food Sources. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(1), 6–29. <https://doi.org/10.1021/jf9400167>
- Gabella, G. (2002). Development of Visceral Smooth Muscle. In B. Brand-Saberi (Ed.), *Vertebrate Myogenesis* (1st ed., pp. 1–37). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-45686-5>
- Gajanan, P. G., Elavarasan, K., & Shamasundar, B. A. (2016). Bioactive and functional properties of protein hydrolysates from fish frame processing waste using plant proteases. *Environ Sci Pollut Res Int*, 23(24), 24901–24911. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7618-9>
- Galanakis, C. M. (2017). Introduction. In C. M. Galanakis (Ed.), *Nutraceutical and Functional Food Components* (pp. 1–14). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805257-0.00001-6>
- Gallego-Rios, S. E., Ramirez-Botero, C. M., Lopez-Marin, B. E., & Velasquez-Rodriguez, C. M. (2018). Evaluation of mercury, lead, and cadmium in the waste material of crevalle jack fish from the Gulf of Uraba, Colombian Caribbean, as a possible raw material in the production of sub-products. *Environ Monit Assess*, 190(3), 115. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6480-2>
- Gallego, M., Mora, L., & Toldrá, F. (2018). Health relevance of antihypertensive peptides in foods. *Current Opinion in Food Science*, 19, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.12.004>
- García-Moreno, P. J., Espejo-Carpio, F. J., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2015). Production and identification of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Mediterranean fish discards. *Journal of Functional Foods*, 18, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.062>
- Gbogouri, G. A., Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2004). Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *Journal of Food Science*, 69(8), C615–C622. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09909.x>
- Gehring, C., Davenport, M., & Jaczynski, J. (2009). Functional and Nutritional Quality of Protein and Lipid Recovered from Fish Processing by-Products and Underutilized Aquatic Species Using Isoelectric Solubilization / Precipitation. *Current Nutrition & Food Science*, 5(1), 17–39. <https://doi.org/10.2174/157340109787314703>
- Ghaly, A. E., Ramakrishnan, V. V., Brooks, M. S., Budge, S. M., & Dave, D. (2013). Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review. *Journal Microbial and Biochemical Technology*, 5, 107–129.

- <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000110>
- Gharbi, N., & Labbafi, M. (2019). Influence of treatment-induced modification of egg white proteins on foaming properties. *Food Hydrocolloids*, 90(November 2018), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.060>
- Ghassem, M., Babji, A. S., Said, M., Mahmoodani, F., & Arihara, K. (2014). Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Snakehead Fish Sarcoplasmic Protein Hydrolysate. *Journal of Food Biochemistry*, 38(2), 140–149. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12031>
- Ghassem, M., Fern, S. S., Said, M., Ali, Z. M., Ibrahim, S., & Babji, A. S. (2011). Kinetic characterization of *Channa striatus* muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology*, 51(3), 467–475. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0526-6>
- Gianfranceschi, G. L., Gianfranceschi, G., Quassinti, L., & Bramucci, M. (2018). Biochemical requirements of bioactive peptides for nutraceutical efficacy. *Journal of Functional Foods*, 47, 252–263. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.034>
- Girgih, A. T., He, R., Hasan, F. M., Udenigwe, C. C., Gill, T. A., & Aluko, R. E. (2015). Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. *Food Chem*, 173, 652–659. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.079>
- Gómez, L. J., Gómez, N. A., Pereañez, J. A., & Zapata, J. E. (2019). Lipids as competitive inhibitors of subtilisin Carlsberg in the enzymatic hydrolysis of proteins in red tilapia (*Oreochromis* sp.) Viscera: Insights from kinetic models and a molecular docking study. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 36(2), 647–655. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190362s20180346>
- Gómez, L. J., Gómez, N. A., Zapata, J. E., Lopez-Garcia, G., Cilla, A., & Alegria, A. (2019). In-vitro antioxidant capacity and cytoprotective/cytotoxic effects upon Caco-2 cells of red tilapia (*Oreochromis* spp.) viscera hydrolysates. *Food Res Int*, 120, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.029>
- Gómez, L. J., & Zapata, J. E. (2017). Efecto del Nivel de Grasa y Velocidad de Agitación en la Hidrolisis Enzimática de Vísceras de Tilapia Roja (*Oreochromis* sp.). *Información Tecnológica*, 28(4), 47–56. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642017000400007>
- Gray, E., Mulloy, B., & Barrowcliffe, T. W. (2008). Heparin and low-molecular-weight heparin. *Thrombosis and Haemostasis*, 99(5), 807–818. <https://doi.org/10.1160/TH08-01-0032>
- Guadix, A., Guadix, E., Páez-Dueñas, M., González-Tello, P., & Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79–89.
- Guerard, F. (2007). Enzymatic methods for marine by-products recovery. In F. Shahidi (Ed.), *Maximising the value of marine by-products* (pp. 107–143). CRC Press.
- Halim, N. R. A., Azlan, A., Yusof, H. M., & Sarbon, N. M. (2018). Antioxidant and

- anticancer activities of enzymatic eel (monopterus sp) protein hydrolysate as influenced by different molecular weight. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.06.006>
- Halim, N. R. A., Yusof, H. M., & Sarbon, N. M. (2016). Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.02.007>
- Hanafi, M. A., Hashim, S. N., Chay, S. Y., Ebrahimpour, A., Zarei, M., Muhammad, K., ... Saari, N. (2018). High angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of Alcalase-digested green soybean (*Glycine max*) hydrolysates. *Food Res Int*, 106, 589–597. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.030>
- Haque, M. A., Timilsena, Y. P., & Adhikari, B. (2016). *Food Proteins, Structure, and Function. Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.03057-2>
- Harada, K., Maeda, T., Hasegawa, Y., Tokunaga, T., Ogawa, S., Fukuda, K., ... Ueno, S. (2011). Antioxidant activity of the giant jellyfish *Nemopilema nomurai* measured by the oxygen radical absorbance capacity and hydroxyl radical averting capacity methods. *Molecular Medicine Reports*, 4(5), 919–922. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.506>
- Hayes, M., & Flower, D. (2013). Bioactive Peptides from Marine Processing Byproducts. In B. Hernández-Ledesma & M. Herrero (Eds.), *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources*. John Wiley & Sons.
- He, R., Girgih, A. T., Malomo, S. A., Ju, X., & Aluko, R. E. (2013). Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 219–227. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.10.008>
- He, S., Franco, C., & Zhang, W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, 50(1), 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.031>
- Hiff, E. (2012). *A trout's Anatomy*. (CDFW, Ed.). California, US: California Department of Fish and Wildlife.
- Hoyle, N. T., & Merritt, J. H. (1994). Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59(1), 1–4.
- Hummel, B. C. (1959). A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(12), 1393–1399.
- Illanes, A., Altamirano, C., & Wilson, L. (2008). Homogeneous Enzyme Kinetics. In A. Illanes (Ed.), *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications* (pp. 107–151). United States: Springer - Verlag New York Inc.
- Indumathi, P., & Mehta, A. (2016). A novel anticoagulant peptide from the Nori hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 20, 606–617. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.016>

- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Wu, J. (2012). Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. *Food Chem*, *135*(4), 3039–3048. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.076>
- Ishak, N. H., & Sarbon, N. M. (2017). Optimization of the enzymatic hydrolysis conditions of waste from shortfin scad (*Decapterus Macrosoma*) for the production of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide using response surface methodology. *International Food Research Journal*, *24*(4), 1735–1743.
- Jacobsen, C. (2016). Oxidative Stability and Shelf Life of Food Emulsions. In M. Hu & C. Jacobsen (Eds.), *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats* (pp. 287–312). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-1-63067-056-6.00008-2>
- Jamil, N. H., Halim, N. R. A., & Sarbon, N. M. (2016). Optimization of enzymatic hydrolysis condition and functional properties of eel (*Monopterus sp.*) protein using response surface methodology (RSM). *International Food Research Journal*, *23*(1), 1–9.
- Jensen, I. J., Eilertsen, K.-E., Mæhre, H. K., Elvevoll, E. O., & Larsen, R. (2013). Health Effects of Antioxidative and Antihypertensive Peptides from Marine Resources. In S. K. Kim (Ed.), *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications* (1st ed., pp. 297–322). John Wiley & Sons, Ltd.
- Jo, H.-Y., Jung, W.-K., & Kim, S.-K. (2008). Purification and characterization of a novel anticoagulant peptide from marine echiuroid worm, *Urechis unicinctus*. *Process Biochemistry*, *43*(2), 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.11.011>
- Jones, D., Caballero, S., & Davidov-Pardo, G. (2019). Bioavailability of nanotechnology-based bioactives and nutraceuticals. In L.-T. Lim & M. Rogers (Eds.), *Advances in Food and Nutrition Research: Food Applications of Nanotechnology* (Vol. 88, pp. 235–273). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.014>
- Jung, H. Y., & Kim, J. K. (2016). Eco-friendly waste management of mackerel wastewater and enhancement of its reutilization value. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *111*, 1–13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.002>
- Jung, W.-K., & Kim, S.-K. (2009). Isolation and characterisation of an anticoagulant oligopeptide from blue mussel, *Mytilus edulis*. *Food Chemistry*, *117*(4), 687–692. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.077>
- Karami, Z., & Akbari-Adergani, B. (2019). Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *J Food Sci Technol*, *56*(2), 535–547. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3549-4>
- Ketnawa, S., Suwal, S., Huang, J., & Liceaga, A. M. (2018). Selective separation and characterisation of dual ACE and DPP-IV inhibitory peptides from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) protein hydrolysates. *International Journal of Food Science & Technology*, *54*(4), 1062–1073. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13939>
- Ketnawa, S., Wickramathilaka, M., & Liceaga, A. M. (2018). Changes on antioxidant activity

- of microwave-treated protein hydrolysates after simulated gastrointestinal digestion: Purification and identification. *Food Chem*, 254, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.133>
- Khan, S., Rehman, A., Shah, H., Aadil, R. M., Ali, A., Shehzad, Q., ... Xia, W. (2020). Fish Protein and Its Derivatives: The Novel Applications, Bioactivities, and Their Functional Significance in Food Products. *Food Reviews International*, 00(00), 1–28. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1828452>
- Kim, S.-K., & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.01.003>
- Kim, S.-K., Wijesekara, I., Park, E. Y., Matsumura, Y., Nakamura, Y., & Sato, K. (2012). Proteins and peptides as antioxidants. In N. S. Hettiarachchy (Ed.), *Bioactive food proteins and peptides: applications in human health* (pp. 97–116). Boca Raton, US: CRC Press.
- Kim, S.-R., & Byun, H.-G. (2012). The Novel Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Rainbow Trout Muscle Hydrolysate. *Fisheries and Aquatic Science*, 15(3), 183–190.
- Klomklao, S., & Benjakul, S. (2018). Protein Hydrolysates Prepared from the Viscera of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*): Antioxidative Activity and Functional Properties. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(1), 69–79. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v18_1_08
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102(4), 1317–1327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016>
- Ko, J.-Y., Kang, N., Lee, J.-H., Kim, J.-S., Kim, W.-S., Park, S.-J., ... Jeon, Y.-J. (2016). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from an enzymatic hydrolysate of flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) muscle as a potent anti-hypertensive agent. *Process Biochemistry*, 51(4), 535–541. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.01.009>
- Korczek, K., Tkaczewska, J., & Migdał, W. (2018). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates in fish products – a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 36(No. 3), 195–207. <https://doi.org/10.17221/283/2017-cjfs>
- Kristinsson, H. G. (2007). Aquatic food protein hydrolysates. In F. Shahidi (Ed.), *Maximising the value of marine by-products* (pp. 229–248). Boca Raton, US: CRC Press.
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000a). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43–81. <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000b). Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease

- mixture. *Process Biochemistry*, 36(1–2), 131–139. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00195-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00195-3)
- Kristinsson, H. G., Theodore, A. E., & Ingadottir, B. (2007). Chemical processing methods for protein recovery from marine by-products and underutilized fish species. In *Maximising the value of marine by-products* (pp. 144–168). Boca Raton, US: CRC Press.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lafarga, T., & Hayes, M. (2017). Bioactive protein hydrolysates in the functional food ingredient industry: Overcoming current challenges. *Food Reviews International*, 33(3), 217–246. <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1175013>
- Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Aydi, M., Toldra, F., Aristoy, M. C., ... Nasri, M. (2015). Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. *Journal of Proteomics*, 128, 458–468. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.05.007>
- Le Gouic, A. V, Harnedy, P. A., & FitzGerald, R. J. (2018). Bioactive Peptides From Fish Protein By-Products. In J. M. Mérillon & K. G. Ramawat (Eds.), *Bioactive Molecules in Food* (pp. 1–35). Springer International Publishing AG. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54528-8_29-1
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. . (2013). *Lehninger Principles of Biochemistry* (6th ed.). United States: W.H. Freeman.
- Leow, J. W. H., & Chan, E. C. Y. (2019). Atypical Michaelis-Menten kinetics in cytochrome P450 enzymes: A focus on substrate inhibition. *Biochemical Pharmacology*, 169(July), 113615. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.08.017>
- Levy, J. H., Sniecinski, R. M., & Welsby, I. (2019). Blood and Coagulation, 837–848. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-48110-6.00043-0>
- Li-Chan, E. C. (2015). Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science*, 1, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.09.005>
- Li, W., Liu, Y., Jiang, W., & Yan, X. (2019). Proximate Composition and Nutritional Profile of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Heads and Skipjack tuna (*Katsuwonus Pelamis*) Heads. *Molecules*, 24(3189), 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules24173189>
- Li, Y., Kong, B., Liu, Q., Xia, X., & Chen, H. (2017). Improvement of the emulsifying and oxidative stability of myofibrillar protein prepared oil-in-water emulsions by addition of zein hydrolysates. *Process Biochemistry*, 53, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.010>
- Liao, W., Jahandideh, F., Fan, H., Son, M., & Wu, J. (2018). Egg Protein-Derived Bioactive Peptides: Preparation, Efficacy, and Absorption. In Fidel Toldra (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 85, pp. 1–58). Academic Press.

<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.02.001>

- Liu, C., Ma, X., Che, S., Wang, C., & Li, B. (2018). The Effect of Hydrolysis with Neutrase on Molecular Weight, Functional Properties, and Antioxidant Activities of Alaska Pollock Protein Isolate. *Journal of Ocean University of China*, 17(6), 1423–1431. <https://doi.org/10.1007/s11802-018-3649-9>
- Liu, R., Xing, L., Fu, Q., Zhou, G. H., & Zhang, W. G. (2016). A Review of Antioxidant Peptides Derived from Meat Muscle and By-Products. *Antioxidants (Basel)*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/antiox5030032>
- Liu, X., Wang, S., Cao, S., He, X., Qin, L., He, M., ... Mao, W. (2018). Structural characteristics and anticoagulant property in vitro and in vivo of a seaweed Sulfated Rhamnan. *Marine Drugs*, 16(7). <https://doi.org/10.3390/md16070243>
- Liu, Y., Li, X., Chen, Z., Yu, J., Wang, F., & Wang, J. (2014). Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. *Food Chemistry*, 151, 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.089>
- Lopes de Souza, F. A., Petenuci, M. E., Camparim, R., Visentainer, J. V., & Inhamuns da Silva, A. J. (2020). Effect of seasonal variations on fatty acid composition and nutritional profiles of siluriformes fish species from the amazon basin. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109051>
- Lopez-Barrera, E. A., & Barragan-Gonzalez, R. G. (2016). Metals and metalloid in eight fish species consumed by citizens of Bogota D.C., Colombia, and potential risk to humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 79(5), 232–243. <https://doi.org/10.1080/15287394.2016.1149130>
- Lowry, O. H., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)
- Mackman, N. (2008). Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature*, 451(7181), 914–918. <https://doi.org/10.1038/nature06797>
- Mada, S. B., Ugwu, C. P., & Abarshi, M. M. (2019). Health Promoting Effects of Food-Derived Bioactive Peptides: A Review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09890-8>
- Malaypally, S. P., Liceaga, A. M., Kim, K. H., Ferruzzi, M., Martin, F. S., & Goforth, R. R. (2014). Influence of molecular weight on intracellular antioxidant activity of invasive silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.06.011>
- Marangoni, A. G. (2002). Characterization of Enzyme Activity. In A. G. Marangoni (Ed.), *Enzyme Kinetics* (pp. 44–60). Canada: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/doi:10.1002/0471267295.ch310.1002/0471267295.ch3>
- Marcolini, E., Babini, E., Bordoni, A., Nunzio, M. Di, Laghi, L., Macz, A., ... Capozzi, F. (2015). Bioaccessibility of the Bioactive Peptide Carnosine during in Vitro Digestion of

- Cured Beef Meat, 5–10. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01157>
- Mariñas-Collado, I., Rivas-López, M. J., Rodríguez-Díaz, J. M., & Santos-Martín, M. T. (2019). Optimal designs in enzymatic reactions with high-substrate inhibition. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 189(April), 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2019.04.005>
- Márquez, M. C., & Vázquez, M. A. (1999). Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 35, 111–117.
- Martínez-Alvarez, O., Batista, I., Ramos, C., & Montero, P. (2016). Enhancement of ACE and prolyl oligopeptidase inhibitory potency of protein hydrolysates from sardine and tuna by-products by simulated gastrointestinal digestion. *Food and Function*, 7(4), 2066–2073. <https://doi.org/10.1039/c5fo01603g>
- Martínez-Alvarez, O., Chamorro, S., & Brenes, A. (2015). Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food Research International*, 73(1069), 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.005>
- Martínez-Araiza, G., Castaño-Tostado, E., Amaya-Llano, S. L., Regalado-González, C., Martínez-Vera, C., & Ozimek, L. (2011). Modeling of Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2596–2601. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0624-5>
- Martínez-Maqueda, D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Miralles, B., & Gómez-Ruiz, J. Á. (2013). Extraction/Fractionation Techniques for Proteins and Peptides and Protein Digestion. In F. Toldrá & L. Nollet (Eds.), *Proteomics in Foods: Principles and Applications* (Vol. 2, pp. 21–50). Boston, MA: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5626-1_2
- Martínez-Medina, G. A., Barragán, A. P., Ruiz, H. A., Ilyina, A., Martínez Hernández, J. L., Rodríguez-Jasso, R. M., ... Aguilar-González, C. N. (2019). Fungal Proteases and Production of Bioactive Peptides for the Food Industry. In M. Kuddus (Ed.), *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 221–246). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00014-1>
- Matsui, T., & Tanaka, M. (2010). Antihypertensive peptides and their underlying mechanisms. In Y. Mine, E. Li-Chan, & B. Jiang (Eds.), *Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals* (pp. 43–54). Blackwell Publishing Ltd. & Institute of Food Technologists.
- Mendis, E., Rajapakse, N., & Kim, S. K. (2005). Antioxidant Properties of a Radical-Scavenging Peptide Purified from Enzymatically Prepared Fish Skin Gelatin Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 581–587.
- Merino, M. C., Bonilla, S. P., & Bages, F. (2013). *Diagnóstico del estado de la Acuicultura en Colombia*. Bogotá, Colombia: FAO.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodtkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an

- international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Moore, J., Yin, J.-J., & Yu, L. (2006). Novel fluorometric assay for hydroxyl radical scavenging capacity (HOSC) estimation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 617–626. Retrieved from <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf052555p>
- Moore, S., Spackman, D. H., & Stein, W. H. (1958). Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins. An Improved System. *Analytical Chemistry*, 30(7), 1185–1190.
- Mora, L., Gallego, M., Aristoy, M. C., Reig, M., & Toldrá, F. (2019). Bioactive peptides. In *Innovative Thermal and Non-Thermal Processing, Bioaccessibility and Bioavailability of Nutrients and Bioactive Compounds* (pp. 333–345). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814174-8.00012-3>
- Morales-Medina, R., Pérez-Gálvez, R., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2016). Artificial neuronal network modeling of the enzymatic hydrolysis of horse mackerel protein using protease mixtures. *Biochemical Engineering Journal*, 105, 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.10.009>
- Moyle, P. B., Quiñones, R. M., Katz, J. V., & Weaver, J. (2015). *Fish Species of Special Concern in California* (3er ed.). Sacramento, California: California Department of Fish and Wildlife (CDFW).
- Naqash, S. Y., & Nazeer, R. A. (2013). Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from pink perch (*Nemipterus japonicus*) muscle. *J Food Sci Technol*, 50(5), 972–978. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0416-y>
- Nasir, S. N. A. M., & Sarbon, N. M. (2019). Angiotensin converting enzyme (ACE), antioxidant activity and functional properties of shortfin scad (*Decapterus macrosoma*) muscle protein hydrolysate at different molecular weight variations. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101254. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101254>
- Nasri, M. (2017). Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Health Benefits. A Review. *Adv Food Nutr Res*, 81, 109–159. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.10.003>
- Nasri, R., Amor, I. Ben, Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P., Gargouri, J., ... Nasri, M. (2012). Anticoagulant activities of goby muscle protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 133(3), 835–841. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.101>
- Nasri, R., Younes, I., Jridi, M., Trigui, M., Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., ... Karra-Châabouni, M. (2013). ACE inhibitory and antioxidative activities of Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) fish protein hydrolysates: Effect on meat lipid oxidation. *Food Research International*, 54(1), 552–561. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.001>
- Neves, A. C., Harnedy, P. A., O’Keeffe, M. B., Alashi, M. A., Aluko, R. E., & FitzGerald, R. J. (2017). Peptide identification in a salmon gelatin hydrolysate with

- antihypertensive, dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidant activities. *Food Research International*, *100*(June), 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.065>
- Neves, A. C., Harnedy, P. A., O’Keeffe, M. B., & FitzGerald, R. J. (2017). Bioactive peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities. *Food Chem*, *218*, 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.053>
- Ngo, D.-H., Vo, T.-S., & Kim, S.-K. (2013). Biological Activities of Marine Bioactive Peptides. In S.-K. Kim (Ed.), *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications* (pp. 509–521). John Wiley & Sons, Ltd.
- Ngo, D.-H., Vo, T.-S., Ryu, B., & Kim, S.-K. (2016). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Pacific cod skin gelatin using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, *51*(10), 1622–1628. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.006>
- Ngo, D.-H., Wijesekara, I., Vo, T.-S., Van Ta, Q., & Kim, S.-K. (2011). Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview. *Food Research International*, *44*(2), 523–529. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.030>
- Nguyen, E., Jones, O., Kim, Y. H. B., San Martin-Gonzalez, F., & Liceaga, A. M. (2017). Impact of microwave-assisted enzymatic hydrolysis on functional and antioxidant properties of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by-products. *Fisheries Science*, *83*(2), 317–331. <https://doi.org/10.1007/s12562-017-1067-3>
- Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved Method for Determining Protein Hydrolysis. *Journal of Food Science*, *66*(5), 642–646.
- Nikoo, M., Benjakul, S., Yasemi, M., Ahmadi Gavlighi, H., & Xu, X. (2019). Hydrolysates from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing by-product with different pretreatments: Antioxidant activity and their effect on lipid and protein oxidation of raw fish emulsion. *Lwt*, *108*, 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.049>
- Nkonge, C., & Ballance, G. M. (1982). A sensitive colorimetric procedure for nitrogen determination in micro-Kjeldahl digests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *30*(3), 416–420. <https://doi.org/10.1021/jf00111a002>
- Noman, A., Qixing, J., Xu, Y., Ali, A. H., Al-Bukhaiti, W. Q., Abed, S. M., & Xia, W. (2019). Influence of Degree of Hydrolysis on Chemical Composition, Functional Properties, and Antioxidant Activities of Chinese Sturgeon (*Acipenser sinensis*) Hydrolysates Obtained by Using Alcalase 2.4L. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, *28*(6), 583–597. <https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1626523>
- Noman, A., Xu, Y., Al-Bukhaiti, W. Q., Abed, S. M., Ali, A. H., Ramadhan, A. H., & Xia, W. (2018). Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. *Process Biochemistry*, *67*, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.009>

- Normah, I., Jamilah, B., Saari, N., & Yaakob, B. (2005). Optimization of hydrolysis conditions for the production of Threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) hydrolysate by Alcalase. *Journal of Muscle Foods*, *16*, 87–102.
- Norris, R., Harnedy, P. A., & FitzGerald, R. J. (2014). Antihypertensive Peptides from Marine Sources. In B. Hernández-Ledesma & M. Herrero (Eds.), *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources* (1st ed., pp. 27–56). John Wiley & Sons, Ltd.
- NTC-4519. (2009). Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Metodo horizontal para el recuento de microorganismos. Tecnica de recuento de colonias a 30°C. (I. C. de N. T. (ICONTEC), Ed.). Instituto Colombiano de Normas Técnicas (ICONTEC).
- NTC-5056. (2002). Calidad del agua. Deteccion y recuento de esporas de anaerobios sulfito reductores - Clostridium. (I. C. de N. T. (ICONTEC), Ed.). Instituto Colombiano de Normas Técnicas (ICONTEC).
- NTC-5443. (2015). Productos provenientes de la acuicultura. Buenas practicas de proceso, transporte y comercialización de las especies cachama, mojarra, tilapia y trucha. (I. C. de N. T. (ICONTEC), Ed.). Instituto Colombiano de Normas Técnicas (ICONTEC).
- NTC-5698. (2009). Microbiología de alimentos y productos de alimentación animal. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. . (I. C. de N. T. (ICONTEC), Ed.). Instituto Colombiano de Normas Técnicas (ICONTEC).
- Nwachukwu, I. D., & Aluko, R. E. (2019). Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. *Journal of Food Biochemistry*, *43*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12761>
- Ohara, H., Matsumoto, H., Ito, K., Iwai, K., & Sato, K. (2007). Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. *J. Agric. Food Chem.*, *55*, 1532–1535.
- Oliveira, K., da Costa, C., da Rocha, M., Gomes, J., Juliano, M. A., Dias, M., ... Prentice, C. (2019). Bioactivity and bioaccessibility of protein hydrolyzates from industrial byproducts of Stripped weakfish (*Cynoscion guatucupa*). *Lwt*, *111*(January), 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.043>
- Opheim, M., Šližytė, R., Sterten, H., Provan, F., Larssen, E., & Kjos, N. P. (2015). Hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) rest raw materials—Effect of raw material and processing on composition, nutritional value, and potential bioactive peptides in the hydrolysates. *Process Biochemistry*, *50*(8), 1247–1257. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.04.017>
- Orsini Delgado, M. C., Galleano, M., Añón, M. C., & Tironi, V. A. (2015). Amaranth Peptides from Simulated Gastrointestinal Digestion: Antioxidant Activity Against Reactive Species. *Plant Foods for Human Nutrition*, *70*(1), 27–34. <https://doi.org/10.1007/s11130-014-0457-2>

- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E. K., Prior, R. L., & Huang, D. (2002). Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(10), 2772–2777. Retrieved from <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf011480w>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Ovissipour, M., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A., & Nazari, R. M. (2012). Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*). *Food and Bioprocess Technology*, *5*(2), 696–705. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0357-x>
- Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., & Shabanpour, B. (2012). Chemical and Biochemical Hydrolysis of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Visceral Protein. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(2), 460–465. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0284-x>
- Pacheco-Aguilar, R., Mazorra-Manzano, M. A., & Ramirez-Suarez, J. C. (2008). Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chem*, *109*(4), 782–789. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.047>
- Pangestuti, R., & Kim, S. K. (2017). Bioactive Peptide of Marine Origin for the Prevention and Treatment of Non-Communicable Diseases. *Marine Drugs*, *15*(3).
- Parhamifar, L., Andersen, H., & Moghimi, S. M. (2013). Nanotechnology for Nucleic Acid Delivery. *Nanotechnology for Nucleic Acid Delivery: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, *948*(9), 13–22. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-140-0>
- Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *26*(3), 716–723. <https://doi.org/10.1021/jf60217a041>
- Pelegrine, D. H. G., & Gasparetto, C. A. (2005). Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *LWT - Food Science and Technology*, *38*(1), 77–80. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.03.013>
- Pereira, C., Costa, J., Sarmiento, B., & Araújo, F. (2016). Cell-based in vitro models for intestinal permeability studies. In B. Sarmiento (Ed.), *Concepts and Models for Drug Permeability Studies* (pp. 57–81). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100094-6.00005-5>
- Petrova, I., Tolstorebrov, I., & Eikevik, T. M. (2018). Production of fish protein hydrolysates step by step: technological aspects, equipment used, major energy costs and methods of their minimizing. *International Aquatic Research*, *10*(3), 223–241. <https://doi.org/10.1007/s40071-018-0207-4>
- Pezechk, S., Ojagh, S. M., Rezaei, M., & Shabanpour, B. (2019). Fractionation of Protein

- Hydrolysates of Fish Waste Using Membrane Ultrafiltration: Investigation of Antibacterial and Antioxidant Activities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(3), 1015–1022. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9483-y>
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3396–3402. <https://doi.org/10.1021/jf9913458>
- Qi, W., & He, Z. (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: mechanism and kinetic model. *Frontiers of Chemistry in China*, 1(3), 308–314. <https://doi.org/10.1007/s11458-006-0026-9>
- Qu, W., Ma, H., Li, W., Pan, Z., Owusu, J., & Venkitasamy, C. (2015). Performance of coupled enzymatic hydrolysis and membrane separation bioreactor for antihypertensive peptides production from *Porphyra yezoensis* protein. *Process Biochemistry*, 50(2), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.11.010>
- Qu, W., Ma, H., Zhao, W., & Pan, Z. (2013). ACE-inhibitory peptides production from defatted wheat germ protein by continuous coupling of enzymatic hydrolysis and membrane separation: Modeling and experimental studies. *Chemical Engineering Journal*, 226, 139–145. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.04.030>
- Rajapakse, N., Jung, W.-K., Mendis, E., Moon, S.-H., & Kim, S.-K. (2005). A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Sciences*, 76(22), 2607–2619. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.12.010>
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597 – 635.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reglamento-582. (2016). Diario Oficial de la Unión Europea: Reglamento sobre metales pesados. (C. de la U. Europea, Ed.). Comisión de la Unión Europea.
- Ren, Q., Xing, H., Bao, Z., Su, B., Yang, Q., Yang, Y., & Zhang, Z. (2013). Recent advances in separation of bioactive natural products. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 21(9), 937–952. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(13\)60560-1](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(13)60560-1)
- Roslan, J., Mustapa Kamal, S. M., Yunos, K. F., & Abdullah, N. (2017). Assessment on multilayer ultrafiltration membrane for fractionation of tilapia by-product protein hydrolysate with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Separation and Purification Technology*, 173, 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.09.038>
- Roslan, J., Yunos, K. F. M., Abdullah, N., & Kamal, S. M. M. (2014). Characterization of

- Fish Protein Hydrolysate from Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) by-Product. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.044>
- Saadi, S., Saari, N., Anwar, F., Hamid, A. A., & Mohd Ghazali, H. (2015). Recent advances in food biopeptides: production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biotechnology Advances*, 33(1), 80–116. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.003>
- Sabbione, A. C., Nardo, A. E., Añón, M. C., & Scilingo, A. (2016). Amaranth peptides with antithrombotic activity released by simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 20, 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.015>
- Sabeena Farvin, K. H., Andersen, L. L., Otte, J., Nielsen, H. H., Jessen, F., & Jacobsen, C. (2016). Antioxidant activity of cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: Fractionation and characterisation of peptide fractions. *Food Chem*, 204, 409–419. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.145>
- Saidi, S., Belleville, M.-P., Deratani, A., & Amar, R. Ben. (2013). Optimization of peptide production by enzymatic hydrolysis of tuna dark muscle by products using commercial proteases . *African Journal of Biotechnology*, 12(13), 1533–1547. <https://doi.org/10.5897/AJB12.2745>
- Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M. P., & Amar, R. Ben. (2014). Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. *Food Research International*, 65, 453–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.026>
- Samaranayaka, A. G. P., Kitts, D. D., & Li-Chan, E. C. Y. (2010). Antioxidative and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory potential of a pacific hake (*Merluccius productus*) fish protein hydrolysate subjected to simulated gastrointestinal digestion and caco-2 cell permeation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1535–1542. <https://doi.org/10.1021/jf9033199>
- Samaranayaka, A. G. P., & Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 229–254. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.05.006>
- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29–46. <https://doi.org/10.1093/fqs/fyx006>
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949–1956. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>
- Sear, J. W. (2019). Antihypertensive Drugs and Vasodilators, 535–555. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-48110-6.00026-0>
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Novel Functional Food Ingredients from Marine Sources. *Current Opinion in Food Science*, 2(Table 1), 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.12.009>
- Sierra, L. M., Sepúlveda, C. T., Vázquez, P., Figueroa, O. A., & Zapata, J. E. (2018).

- Byproducts of aquaculture processes: Development and prospective uses. Review. *Vitae*, 25(3), 128–140. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v25n3a03>
- Sila, A., & Bougatef, A. (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods*, 21, 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.007>
- Silva, J. F. X., Ribeiro, K., Silva, J. F., Cahú, T. B., & Bezerra, R. S. (2014). Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. *Animal Feed Science and Technology*, 196(November 2015), 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.06.010>
- Singh, P., & Kumar, S. (2019). Microbial Enzyme in Food Biotechnology. In M. Kuddus (Ed.), *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 19–28). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00002-5>
- Slizyte, R., Rommi, K., Mozuraityte, R., Eck, P., Five, K., & Rustad, T. (2016). Bioactivities of fish protein hydrolysates from defatted salmon backbones. *Biotechnology Reports*, 11, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.08.003>
- Soares de Castro, R. J., & Sato, H. H. (2015). Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*, 74, 185–198. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.013>
- Sri Kantha, S., Takeuchi, M., Watabe, S., & Ochi, H. (2000). HPLC Determination of Carnosine in Commercial Canned Soups and Natural Meat Extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 33(1), 60–62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/fstl.1999.0602>
- Sripokar, P., Benjakul, S., & Klomklao, S. (2019). Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates obtained from starry triggerfish muscle using trypsin from albacore tuna liver. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.12.013>
- Steinsholm, S., Oterhals, Å., Underhaug, J., Måge, I., Malmendal, A., & Aspevik, T. (2020). Sensory Assessment of Fish and Chicken Protein Hydrolysates. Evaluation of NMR Metabolomics Profiling as a New Prediction Tool. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(12), 3881–3890. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07828>
- Suwal, S., Ketnawa, S., Liceaga, A. M., & Huang, J.-Y. (2018). Electro-membrane fractionation of antioxidant peptides from protein hydrolysates of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) byproducts. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 45, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.016>
- Sveinsdottir, H., Hamaguchi, P. Y., Bakken, H. E., & Kristinsson, H. G. (2014). Methods for assessing the antioxidative activity of aquatic food compounds. In H. G. Kristinsson (Ed.), *Antioxidants and Functional Components in Aquatic Foods* (1st ed., pp. 151–174). John Wiley & Sons, Ltd.

- Syed, A. A., & Mehta, A. (2018). Target Specific Anticoagulant Peptides: A Review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 24(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10989-018-9682-0>
- Taheri, A., Anvar, S. A. A., Ahari, H., & Fogliano, V. (2013). Comparison the functional properties of protein Hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(1), 154–169.
- Tamer, C. E., & Çopur, Ö. U. (2016). Bioavailability and delivery of nutraceuticals by nanoparticles. In A. Grumezescu (Ed.), *Nutraceuticals* (pp. 535–591). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804305-9.00014-2>
- Tan, Y., Chang, S. K. C., & Meng, S. (2019). Comparing the kinetics of the hydrolysis of by-product from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fillet processing by eight proteases. *Lwt*, 111, 809–820. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.053>
- Tejpal, C. S., Vijayagopal, P., Elavarasan, K., Linga Prabu, D., Lekshmi, R. G. K., Asha, K. K., ... Mathew, S. (2017). Antioxidant, functional properties and amino acid composition of pepsin-derived protein hydrolysates from whole tilapia waste as influenced by pre-processing ice storage. *J Food Sci Technol*, 54(13), 4257–4267. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2897-9>
- Terashima, M., Baba, T., Ikemoto, N., Katayama, M., Morimoto, T., & Matsumura, S. (2010). Novel angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from boneless chicken leg meat. *J Agric Food Chem*, 58(12), 7432–7436. <https://doi.org/10.1021/jf100977z>
- Thuanthong, M., De Gobba, C., Sirinupong, N., Youravong, W., & Otte, J. (2017). Purification and characterization of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatine produced by an enzymatic membrane reactor. *Journal of Functional Foods*, 36, 243–254. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.011>
- Tkaczewska, J., Borawska-Dziadkiewicz, J., Kulawik, P., Duda, I., Morawska, M., & Mickowska, B. (2020). The effects of hydrolysis condition on the antioxidant activity of protein hydrolysate from *Cyprinus carpio* skin gelatin. *Lwt*, 117(September 2019). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108616>
- Tkaczewska, J., Jamroz, E., Kulawik, P., Morawska, M., & Szczurowska, K. (2019). Evaluation of the potential use of a carp (*Cyprinus carpio*) skin gelatine hydrolysate as an antioxidant component. *Food Funct*, 10(2), 1038–1048. <https://doi.org/10.1039/c8fo02492h>
- Toldra, F., Reig, M., Aristoy, M. C., & Mora, L. (2018). Generation of bioactive peptides during food processing. *Food Chem*, 267, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.119>
- Toopcham, T., Mes, J. J., Wichers, H. J., Roytrakul, S., & Yongsawatdigul, J. (2017). Bioavailability of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 proteinases hydrolyzed tilapia muscle

- proteins. *Food Chem*, 220, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.183>
- Torres, J. A., Chen, Y. C., Rodrigo-Garcia, J., & Jaczynski, J. (2007). Recovery of by-products from seafood processing streams. In *Maximising the value of marine by-products* (pp. 65–90). Boca Raton, US: CRC Press.
- Trusek-Holownia, A. (2008). Production of protein hydrolysates in an enzymatic membrane reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 39(2), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.09.010>
- Valencia, P., Espinoza, K., Ceballos, A., Pinto, M., & Almonacid, S. (2015). Novel modeling methodology for the characterization of enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, 50(4), 589–597. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.028>
- Valencia, P., Pinto, M., & Almonacid, S. (2014). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, 49(2), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.11.012>
- Valencia, P., Solis, T., Rojas, P., Ibañez, F., Astudillo-Castro, C., Pinto, M., & Almonacid, S. (2019). Proteolytic susceptibility of food by-product proteins: An evaluation by means of a quantitative index. *Process Biochemistry*, 77, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.11.009>
- Vargas-Licon, S. P., & Marrugo-Negrete, J. L. (2019). Mercurio, metilmercurio y otros metales pesados en peces de Colombia: riesgo por ingesta. *Acta Biológica Colombiana*, 24(2), 232–242. <https://doi.org/10.15446/abc.v24n2.74128>
- Vazquez, J. A., Meduina, A., Duran, A. I., Nogueira, M., Fernandez-Compas, A., Perez-Martin, R. I., & Rodriguez-Amado, I. (2019). Production of Valuable Compounds and Bioactive Metabolites from By-Products of Fish Discards Using Chemical Processing, Enzymatic Hydrolysis, and Bacterial Fermentation. *Mar Drugs*, 17(3). <https://doi.org/10.3390/md17030139>
- Vergara-Estupiñán, E. J., & Rodríguez-Africano, P. E. (2015). Presencia de mercurio, plomo y cobre en tejidos de *Oreochromis niloticus*: sector de la cuenca alta del Rio Chicamocha, vereda Volcán, Paipa, Colombia. *Producción + Limpia*, 10(2), 114–126.
- Villamil, O., Vaquiro, H., & Solanilla, J. F. (2017). Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. *Food Chem*, 224, 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.057>
- Wahed, A., Quesada, A., & Dasgupta, A. (2020). Essentials of coagulation. In *Hematology and Coagulation* (pp. 237–264). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814964-5.00016-4>
- Wald, M., Schwarz, K., Rehbein, H., Bußmann, B., & Beermann, C. (2016). Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. *Food Chemistry*, 205, 221–228. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.002>
- Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., Song, H., & Li, P. (2010). Potential antioxidant and

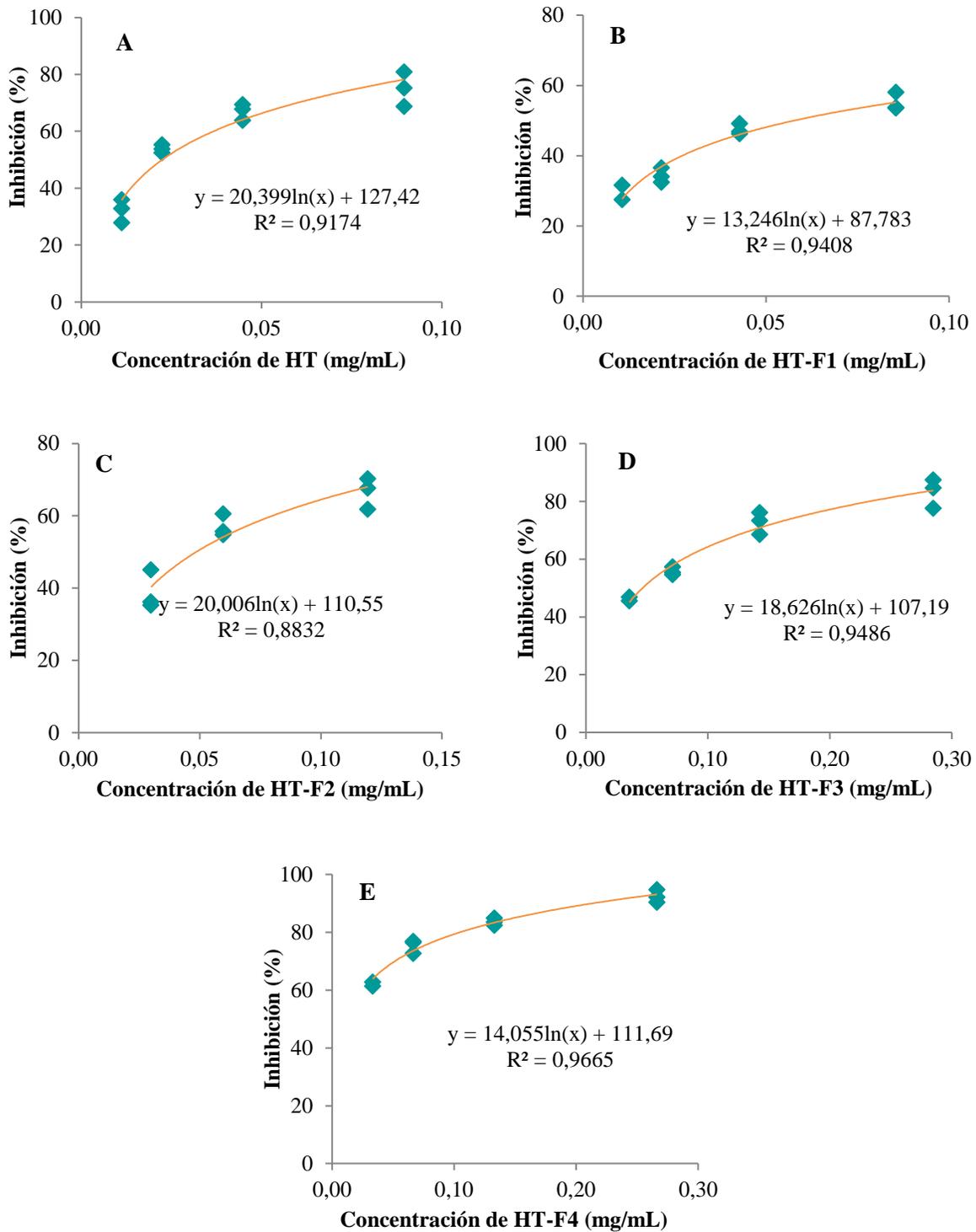
- anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int J Biol Macromol*, 46(1), 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2009.10.015>
- Wasswa, J., Tang, J., & Gu, X. (2008). Optimization of the production of hydrolysates from grass carp (*ctenopharyngodon idella*) skin using alcalase. *Journal of Food Biochemistry*, 32, 460–473.
- Wilson, J., Hayes, M., & Carney, B. (2011). Angiotensin-I-converting enzyme and prolyl endopeptidase inhibitory peptides from natural sources with a focus on marine processing by-products. *Food Chemistry*, 129(2), 235–244. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.04.081>
- Wisuthiphaet, N., Klinchan, S., & Kongruang, S. (2016). Fish Protein Hydrolysate Production by Acid and Enzymatic Hydrolysis. *King Mongkut's University of Technology North Bangkok International Journal of Applied Science and Technology*, 9(4), 261–270. <https://doi.org/10.14416/j.ijast.2016.11.004>
- Wong, F. C., Xiao, J., Ong, M. G. L., Pang, M. J., Wong, S. J., Teh, L. K., & Chai, T. T. (2019). Identification and characterization of antioxidant peptides from hydrolysate of blue-spotted stingray and their stability against thermal, pH and simulated gastrointestinal digestion treatments. *Food Chemistry*, 271(July 2018), 614–622. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.206>
- Wouters, A. G. B., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2016). Relevance of the Functional Properties of Enzymatic Plant Protein Hydrolysates in Food Systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(4), 786–800. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12209>
- Wu, G. (2020). Important roles of dietary taurine , creatine , carnosine , anserine and 4 - hydroxyproline in human nutrition and health. *Amino Acids*, 52, 329–360. <https://doi.org/10.1007/s00726-020-02823-6>
- Wu, H., Chen, H., & Shiau, C. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*), 36, 949–957. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00104-2)
- Wu, W., Li, B., Hou, H., Zhang, H., & Zhao, X. (2017). Identification of iron-chelating peptides from Pacific cod skin gelatin and the possible binding mode. *Journal of Functional Foods*, 35, 418–427. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.013>
- Wubshet, S. G., Lindberg, D., Veiseth-Kent, E., Kristoffersen, K. A., Böcker, U., Washburn, K. E., & Afseth, N. K. (2019). Bioanalytical Aspects in Enzymatic Protein Hydrolysis of By-Products. In C. M. Galanakis (Ed.), *Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications* (pp. 225–258). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816695-6.00008-8>
- Xiong, Y. L. (2010). Antioxidant peptides. In Y. Mine, E. Li-Chan, & B. Jiang (Eds.), *Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals* (pp. 29–42). John Wiley & Sons.

- Xu, Q., Hong, H., Wu, J., & Yan, X. (2019). Bioavailability of bioactive peptides derived from food proteins across the intestinal epithelial membrane: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 399–411. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.050>
- Yan, Y., Xu, L. C., Vogler, E. A., & Siedlecki, C. A. (2018). Contact activation by the intrinsic pathway of blood plasma coagulation, 3–28. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100497-5.00001-x>
- Yathisha, U. G., Bhat, I., Karunasagar, I., & Mamatha S., B. (2018). Antihypertensive activity of fish protein hydrolysates and its peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1–12. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1452182>
- Yi, J., De Gobba, C., Skibsted, L. H., & Otte, J. (2016). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activity of bioactive peptides produced by enzymatic hydrolysis of skin from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *International Journal of Food Properties*, 20(5), 1129–1144. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1203932>
- Yi, J., De Gobba, C., Skibsted, L. H., & Otte, J. (2017). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activity of bioactive peptides produced by enzymatic hydrolysis of skin from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *International Journal of Food Properties*, 20(5), 1129–1144. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1203932>
- Zapata, J. E., Giraldo, D. E., & Baéz, A. J. (2018). Kinetic modeling of the enzymatic hydrolysis of proteins of visceras from red tilapia (*Oreochromis sp.*): Effect of substrate and enzyme concentration. *Revista Vitae*, 25(1), 17–25. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v25n1a03>
- Zapata, J. E., Moya, M., & Figueroa, O. A. (2019). Hidrólisis Enzimática de la Proteína de Vísceras de Trucha Arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*): Efecto del tipo de Enzima , Temperatura , pH y Velocidad de Agitación. *Información Tecnológica*, 30(6), 63–72.
- Zeng, M., Zhao, Y., Liu, Z., & Dong, S. (2013). ACE-inhibitory Activities of Marine Proteins and Peptides. In S.-K. Kim (Ed.), *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications* (1st ed., pp. 431–440). John Wiley & Sons, Ltd.
- Zhang, C., Zhang, Y., Wang, Z., Chen, S., & Luo, Y. (2017). Production and identification of antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibition and dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) muscle hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 35, 224–235. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.032>
- Zhang, L., Zhao, G. X., Zhao, Y. Q., Qiu, Y. T., Chi, C. F., & Wang, B. (2019). Identification and Active Evaluation of Antioxidant Peptides from Protein Hydrolysates of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) Head. *Antioxidants*, 8, 1–16. <https://doi.org/10.3390/antiox8080318>
- Zhang, Y., Duan, X., & Zhuang, Y. (2012). Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. *Peptides*, 38(1), 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.014>

Zhang, Y., Ma, L., & Otte, J. (2016). Optimization of Hydrolysis Conditions for Production of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Basa Fish Skin Using Response Surface Methodology. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(5), 684–693. <https://doi.org/10.1080/10498850.2014.919049>

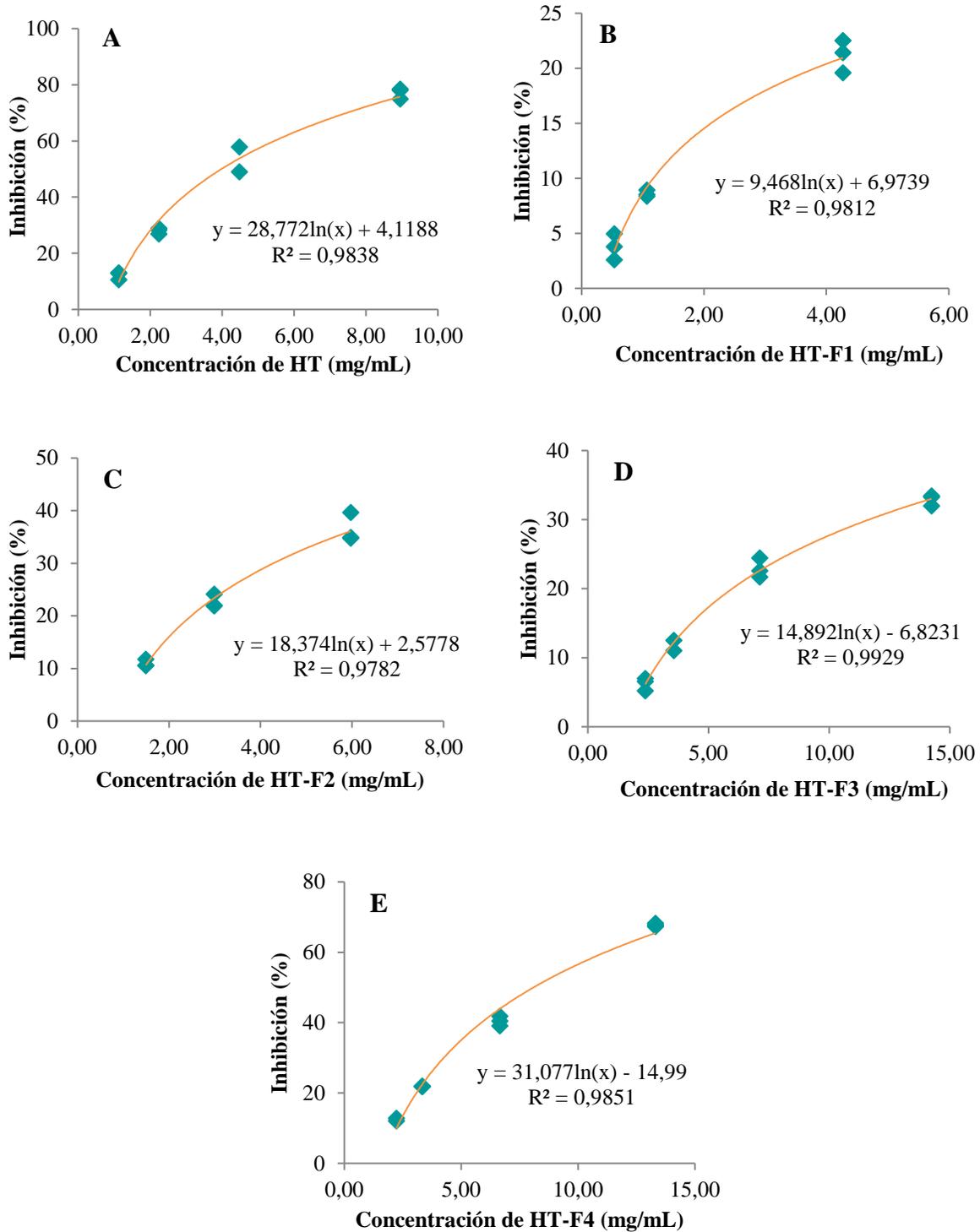
8. ANEXOS

Anexo I. Curvas dosis-respuesta para la actividad ORAC de las fracciones de HT



A. Hidrolizado (GH 20%); **B.** MW > 100 kDa; **C.** MW 100 – 10 kDa; **D.** MW 10 – 3 kDa; **E.** MW < 3 kDa.

Anexo II. Curvas dosis-respuesta para la actividad HORAC de las fracciones de HT



A. Hidrolizado (GH 20%); **B.** MW > 100 kDa; **C.** MW 100 – 10 kDa; **D.** MW 10 – 3 kDa; **E.** MW < 3 kDa.