



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

**REVALORACIÓN DE ESCAMAS Y ESQUELETOS
DE TILAPIA ROJA (*Oreochromis spp.*) PARA LA
OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS**

Leidy Maritza Sierra Lopera

Universidad de Antioquia

Facultad Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Departamento de Alimentos

Medellín. Colombia



REVALORACIÓN DE ESCAMAS Y ESQUELETOS DE TILAPIA ROJA PARA LA
OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

Leidy Maritza Sierra Lopera

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Asesor:

José Edgar Zapata Montoya
Doctor en Biotecnología

Línea de Investigación:

Biotecnología-Alimentos

Grupo de Investigación:

Nutrición y Tecnología de Alimentos

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Medellín, Colombia

2021

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	2
1.1	Planteamiento del Problema	2
1.2	Objetivos	3
1.2.1	Objetivo General.....	3
1.2.2	Objetivos Específicos	3
2	MARCO TEÓRICO	6
2.1	Tilapia roja (<i>Oreochromis spp.</i>).....	6
2.2	Subproductos piscícolas.....	7
2.2.1	Escamas	8
2.2.2	Esqueletos.....	9
2.3	Hidrólisis de proteínas	10
2.3.1	Hidrólisis alcalina.....	11
2.3.2	Hidrólisis enzimática	12
2.4	Purificación de péptidos.....	17
2.5	Péptidos antioxidantes	18
2.6	Escalado de proceso de hidrólisis	20
3	METODOLOGÍA	23
3.1	Pretratamiento de la materia prima	23
3.2	Reactivos e insumos.....	23
3.3	Métodos analíticos	24
3.3.1	Análisis proximal.....	24
3.3.2	Actividad enzimática	24
3.3.3	Cuantificación de proteína por Biuret	24
3.3.4	Composición total de aminoácidos.....	25
3.4	Selección del sustrato de trabajo.....	25
3.5	Hidrólisis alcalina	26
3.5.1	Efectos de la concentración de NaOH, la temperatura y el porcentaje de escamas sobre la hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja.....	26
3.5.2	Efecto del tiempo sobre la hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja.....	27

Se evaluó el tiempo de la hidrólisis alcalina en las condiciones optimas de concentración de NaOH, la temperatura y el porcentaje de escamas determinadas en la

sección 3.5.1, los tiempos fueron 2, 4 y 8 h y las variables evaluadas fueron concentración de proteína soluble (P) (g/L) medida por Biuret y capacidad antioxidante medida por ABTS, FRAP y AQH.....	27
3.6 Hidrólisis enzimática	27
3.6.1 Determinación del número total de enlaces peptídicos	27
3.6.2 Descripción del proceso de hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja.	27
3.6.3 Efecto del pH y temperatura sobre la hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja.....	28
3.6.4 Actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos de la hidrólisis con Alcalase® 2.4 L y Flavourzyme® 500 L	28
3.6.5 Parámetros cinéticos de la hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja usando Alcalase® 2.4 L	29
3.6.6 Efecto de la concentración de sustrato y enzima en la hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja.....	29
3.6.7 Efecto del grado de hidrólisis sobre la actividad antioxidante de los hidrolizados enzimáticos de escamas de tilapia roja.....	29
3.7 Escalado de hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja	30
3.8 Actividad antioxidante	30
3.9 Separación y purificación de fracciones peptídicas con propiedades biológicas ..	32
3.9.1 Remoción de la sal de hidrolizado alcalino	32
3.9.2 Fraccionamiento por ultrafiltración	32
3.9.3 Purificación por HPLC	33
3.10 Secuenciación de péptidos con propiedades biológicas.....	33
3.11 Evaluación de la actividad antioxidante mediante análisis basados en células	33
3.11.1 Cultivo y tratamiento de células A7r5 diferenciadas.....	33
3.11.2 Efecto citotóxico sobre las células A7r5	34
3.11.3 Efecto citoprotector sobre las células A7r5.....	35
3.12 Análisis estadístico	35
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
4.1 Caracterización de escamas y esqueletos.....	38
4.2 Selección del sustrato de trabajo.....	40
4.3 Hidrólisis alcalina de escamas	41
4.3.1 Efectos de temperatura, concentración de NaOH y porcentaje de escamas sobre la hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja.....	41
4.3.2 Efecto del tiempo sobre la hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja.....	49

4.4	Hidrólisis enzimática de escamas	51
4.4.1	Determinación del h_{TOT} en escamas	51
4.4.2	Efecto del pH y T sobre la hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja..	51
4.4.3	Efecto del tipo de enzima sobre la actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos	57
4.4.4	Parámetros cinéticos de la hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja usando Alcalase® 2.4 L	59
4.4.5	Efecto de S y E sobre la hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja	60
4.4.6	Efecto del GH sobre la actividad antioxidante de los hidrolizados enzimáticos de escamas de tilapia roja.....	64
4.5	Escalado de hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja.....	67
4.6	Purificación de los hidrolizados.....	69
4.6.1	Efecto de la sal sobre la actividad antioxidante del hidrolizado alcalino	69
4.6.2	Fraccionamiento de los hidrolizados enzimático y alcalino	70
4.7	Efecto citotóxico de los hidrolizados alcalino y enzimático en la viabilidad y crecimiento de las células A7r5.	72
4.8	Evaluación de la actividad antioxidante sobre células A7r5	73
4.8.1	Efecto de los hidrolizados contra el estrés oxidativo sobre células A7r5	73
4.8.2	Efecto de las fracciones de los hidrolizados alcalino y enzimático contra el estrés oxidativo sobre células VSMC	75
4.9	Separación por HPLC de la fracción con mayor actividad antioxidante <i>in vitro</i> en células A7r5	79
4.10	Secuenciación del pico con mayor actividad antioxidante	81
5	CONCLUSIONES	86
6	RECOMENDACIONES	89
7	DIFUSION DE RESULTADOS.....	92
8	REFERENCIAS	95

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición proximal de escamas y esqueletos.....	38
Tabla 2. Concentración relativa de aminoácidos en escamas y esqueletos	39
Tabla 3. Diseño experimental de superficie de respuesta central compuesto para evaluación del efecto de T, N, S sobre la hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja.	42
Tabla 4. Valores P de las variables respuesta en el diseño central compuesto de la hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja.....	43
Tabla 5. Verificación experimental de las condiciones definidas en la optimización de la hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja.....	49
Tabla 6. Evaluación de variables P, ABTS, FRAP y AQH en función del tiempo en la hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja.....	50
Tabla 7. Concentración relativa de aminoácidos en el hidrolizado alcalino	50
Tabla 8. Diseño experimental de superficie de respuesta central compuesto para evaluación del efecto de pH y T sobre la hidrólisis de escamas de tilapia roja con Alcalase® 2.4 L y Flavourzyme® 500 L.....	51
Tabla 9. Valores P de los modelos de pH y temperatura para Alcalase® 2.4 L y Flavourzyme® 500 L.....	52
Tabla 10. Valores predichos y experimentales para P y GH usando Alcalase® 2.4 L y Flavourzyme® 500 L en las condiciones óptimas de pH y T.	56
Tabla 11. Actividades antioxidantes de los hidrolizados enzimáticos de escamas de tilapia roja usando Alcalase® 2.4 L y Flavourzyme® 500 L.....	57
Tabla 12. Diseño central compuesto para concentración de sustrato y enzima en Alcalase® 2.4 L.....	60
Tabla 13. ANOVA para el efecto de la concentración de sustrato y enzima en Alcalase® 2.4 L.....	61
Tabla 14. Valores predichos y experimentales para P, GH, ABTS y AQH en las condiciones óptimas de S y E.....	63
Tabla 15. Actividad antioxidante y proteína soluble en diferentes GH de los hidrolizados enzimáticos de escamas de tilapia roja usando Alcalasa® 2.4 L	65

Tabla 16. Concentración relativa de aminoácidos en el hidrolizado enzimático GH 12 de escamas de tilapia roja.....	66
Tabla 17. Efecto del cambio de escala sobre las propiedades de los hidrolizados enzimáticos de escamas de tilapia roja	68
Tabla 18. Efecto del contenido de sal en las actividades antioxidantes (ABTS y FRAP) en el hidrolizado alcalino de escamas de tilapia roja	69
Tabla 19. Actividad antioxidante de las fracciones de diferente peso molecular del hidrolizado alcalino de escamas de tilapia roja	70
Tabla 20. Actividad antioxidante de las fracciones de diferente peso molecular del hidrolizado enzimático GH 12.....	71
Tabla 21. Porcentaje de viabilidad celular.....	72
Tabla 22. Medias de las intensidades de fluorescencia luego del estrés oxidativo en las células del músculo liso vascular (A7r5) y la acción de los hidrolizados completos.....	73
Tabla 23. Medias de las intensidades de fluorescencia luego del estrés oxidativo en las células del músculo liso vascular (A7r5) y acción de las fracciones del hidrolizado alcalino	76
Tabla 24. Medias de las intensidades de fluorescencia luego del estrés oxidativo en las células del músculo liso vascular (A7r5) y acción de las fracciones del hidrolizado enzimático.....	77
Tabla 25. Medias de las intensidades de fluorescencia luego del estrés oxidativo en las células del músculo liso vascular (A7r5) y acción de las fracciones por HPLC obtenidas de fracción 3-10 kDa del hidrolizado enzimático.	80
Tabla 26. Secuencia de péptidos de F2 y F3	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tilapia roja (<i>Oreochromis spp.</i>) tomado de DANE, 2014	6
Figura 2. Subproductos de pescado y productos derivados. Tomado de Benjakul et al., (2019).	7
Figura 3. Escamas de tilapia roja.....	8
Figura 4. Microestructura de escamas de pescado. Tomado de Ahmad Fara & Abdullah, 2016	9
Figura 5. Esqueletos de tilapia roja	10
Figura 6. Cargas de las proteínas en el proceso de solubilización. Tomado de Surasani, 2018	12
Figura 7. Representación de la hidrólisis de proteínas a $\text{pH} > 7$	14
Figura 8. Concentración de proteína soluble durante la hidrólisis alcalina de escamas y esqueletos.	40
Figura 9. Variación del GH en el tiempo para la hidrólisis enzimática de escamas y esqueletos.	41
Figura 10. Gráficos 3D de superficie de respuesta para los efectos de interacción de variables independientes de N (M), T ($^{\circ}\text{C}$) y S (%) sobre la variable dependiente P (g/L). 45	
Figura 11. Gráficos 3D de superficie de respuesta para los efectos de interacción de variables independientes de N (M), T ($^{\circ}\text{C}$) y S (%) sobre la variable dependiente ABTS ($\mu\text{M ET/L}$)	46
Figura 12. Gráficos 3D de superficie de respuesta para los efectos de interacción de variables independientes de N (M), T ($^{\circ}\text{C}$) y S (%) sobre la variable dependiente FRAP ($\mu\text{M ET/L}$)	47
Figura 13. Gráficos 3D de superficie de respuesta para los efectos de interacción de variables independientes de N (M), T ($^{\circ}\text{C}$) y S (%) sobre la variable dependiente AQH (%)	48

Figura 14. Gráficos 3D de superficie de respuesta para los efectos de interacción de variables independientes de pH y temperatura (°C) usando Alcalase® 2.4 L sobre las variables dependientes GH (a) y proteína (b).....	54
Figura 15. Gráficos 3D de superficie de respuesta para los efectos de interacción de variables independientes de pH y temperatura (°C) usando Flavourzyme® 500 L sobre las variables dependientes GH (a) y proteína (b).....	55
Figura 16. Curva de saturación de Alcalase® 2.4 L: La velocidad inicial (mM/seg) vs concentración de proteína (mM).	59
Figura 17. Gráficos 3D de superficie de respuesta para los efectos de interacción de las variables independientes S (g/L) y E (g/L) usando Alcalasa® 2.4 L sobre las variables dependientes P (g/L), GH (%), ABTS (µM ET/g prot) y AQH. (%)	63
Figura 18. Actividad antioxidante y proteína soluble de los hidrolizados enzimáticos preparados usando Alcalasa® 2.4 L con diferentes GHs y tiempos.	65
Figura 19. Efecto antioxidante de los hidrolizados alcalino y enzimático en las células del músculo liso vascular (A7r5).....	74
Figura 20. Efecto antioxidante del hidrolizado alcalino y sus fracciones en las células del músculo liso vascular (A7r5).....	77
Figura 21. Efecto antioxidante del hidrolizado enzimático y sus fracciones en las células del músculo liso vascular (A7r5).....	78
Figura 22. Cromatograma RP-HPLC de la separación de la fracción 3-10kDa del hidrolizado enzimático en una columna C-bridge X18 (10 x 150 mm, 5 µm).....	79
Figura 23. Efecto antioxidante de las fracciones provenientes de la seraparación por RP-HPLC de la fracción 3-10kDa proveniente del hidrolizado enzimático de escamas de tilapia roja en las células del músculo liso vascular (A7r5).	81
Figura 24. Espectro LC-MS/MS de F2 (a) y F3 (b) de la fracción 3-10kDa del hidrolizado enzimático de escamas de tilapia roja preparado con Alcalasa® 2.4L.....	82

GLOSARIO

ANOVA:	Análisis de la varianza
AQH:	Actividad quelante de hierro
DS:	Desviación estándar
E:	Concentración de enzima
E/S:	Relación enzima sustrato
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FRAP:	Poder antioxidante reductor del hierro
GH:	Grado de hidrólisis
h:	Enlaces peptídicos rotos
h _{TOT} :	Número total de enlaces peptídicos en una proteína
K _m :	Constante de Michaelis-Menten
LC-MS/MS:	Cromatografía líquida con espectrometría de masas.
MSR	Metodología de superficies de respuesta
QTOF:	Espectrómetro de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo
ORAC:	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
P:	Concentración de producto
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
RP-HPLC:	Cromatografía líquida en fase reversa
S:	Concentración de sustrato
T:	Temperatura
V:	Velocidad inicial de reacción
V _{max} :	Velocidad máxima de reacción
VSMC:	Vascular smooth muscle cells

RESUMEN

El aprovechamiento de subproductos es un tema que se ha venido investigando en los últimos años como una estrategia para el cuidado del medio ambiente y la producción sostenible de múltiples industrias, como es el caso de la piscicultura. La tilapia roja (*Oreochromis spp.*) es la especie que más se cultiva en el país con el 51.8% de la producción nacional. Las escamas y los esqueletos son algunos de los subproductos generados en el procesamiento de esta especie, por esto surge la necesidad de la búsqueda de alternativas para su valoración. Inicialmente se seleccionó el sustrato teniendo en cuenta que se obtuviera la mayor extracción de proteína soluble luego de la hidrólisis alcalina y enzimática, las escamas fue el sustrato seleccionado para continuar el proyecto de investigación. Posteriormente, se optimizó la hidrólisis alcalina y enzimática de escamas de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) para la obtención de hidrolizados con actividad antioxidante. Los hidrolizados obtenidos fueron separados usando membranas de ultrafiltración para obtener fracciones de diferentes pesos moleculares y se evaluó la actividad antioxidante por medio de pruebas *in vitro*. Adicionalmente, se evaluó el efecto citotóxico de los hidrolizados y sus fracciones en la línea de células de músculo liso (VSMC A7r5); de acuerdo con los resultados de las pruebas *in vitro* en células se seleccionó la fracción que debía ser sometida a proceso de purificación por RP-HPLC, los péptidos antioxidantes fueron identificados por cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem. Los resultados indican que las escamas de tilapia roja podrían ser una fuente natural de péptidos antioxidantes.

Palabras claves: tilapia roja (*Oreochromis spp.*), hidrólisis enzimática, péptidos bioactivos, antioxidante, especies reactivas de oxígeno, grado de hidrólisis.

ABSTRACT

The use of by-products is a topic that has been investigated in recent years as a strategy for caring for the environment and the sustainable production of multiple industries, such as the fish farming. The red tilapia (*Oreochromis spp.*) is the species that is most cultivated in the country with 51.8% of the national production. The scales and skeletons are some of the by-products generated in the processing of this species, for this reason the need arises to search for alternatives for their evaluation. Initially, the substrate was selected considering the highest extraction of soluble protein after the hydrolysis alkaline and enzymatic, the scales were the substrate selected to continue this project. Subsequently, the alkaline and enzymatic hydrolysis of red tilapia (*Oreochromis spp.*) scales was optimized to obtain hydrolysates with antioxidant activity. The hydrolysates obtained were separated using ultrafiltration membranes to obtain fractions of different molecular weights and the antioxidant activity was evaluated by in vitro tests. Additionally, the cytotoxic effect of the hydrolysates and their fractions was evaluated in the smooth muscle cell line (VSMC A7r5). According to the results of in vitro tests on cells, a fraction was separated using RP-HPLC and the antioxidant peptides were identified by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. The results indicate that the red tilapia (*Oreochromis spp.*) scale could be a new natural source of antioxidant peptides.

Keywords: red tilapia (*Oreochromis spp.*), enzymatic hydrolysis, bioactive peptides, antioxidant, reactive oxygen species, degree hydrolysis

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del Problema

La producción pesquera y acuícola a nivel mundial ascendió a un total de 179 millones de toneladas en 2018, que generaron ingresos alrededor de 401000 millones de USD, de los cuales 250000 millones de USD corresponde a la producción acuícola (FAO, 2020). Para el caso particular de las especies de agua dulce como la carpa, el bagre y la tilapia representarán alrededor del 62% de la producción acuícola mundial total en 2030, en comparación con el 58% registrado en 2016, lo cual indica el crecimiento de la producción de estas especies (FAO, 2020).

En Colombia, la acuicultura pasó de una producción de 9.200 toneladas en 1990 a 120230 en 2017, siendo tilapia roja (*Oreochromis spp.*), tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) y la mojarra negra (*Oreochromis mossambicus*), las especies más cultivadas comercialmente con un 58.5% de la producción total (DANE, 2014; Villanueva Soto, 2020) donde el 51.8% corresponde a la tilapia roja (*Oreochromis spp.*) convirtiéndose en la especie que más se cultiva en el país (Mojica et al., 2018). En la industria piscícola solo alrededor del 40% se destina al consumo humano y el 60% restante generalmente se vierte o se destina a aplicaciones de bajo valor añadido tales como alimentos para animales, harina de pescado y fertilizante (Chalamaiah et al., 2012; Shen et al., 2019). Específicamente en el procesamiento de la tilapia, entre el 60%-70% del cuerpo es subproducto, y en términos porcentuales se componen de restos de fileteo (15-20%), piel y aletas (1-3%), esqueletos (9-15%), cabezas (9-12%), vísceras (12-18%) y escamas (5%) (Chalamaiah et al., 2012; Shen et al., 2019). En Colombia para el año 2014, los subproductos alcanzaron cerca de 37 mil toneladas anuales, de los cuales 1.9 mil toneladas son de escamas y 3.3 mil toneladas son de esqueletos (Silva et al., 2014).

Por otro lado, los residuos piscícolas pueden generar problemas de contaminación ambiental (Chalamaiah et al., 2012; Shen et al., 2019), debido a que su alto contenido en nutrientes puede generar la floración de algas, una disminución de oxígeno, una turbiedad

creciente y otros cambios en la calidad del agua, por lo que su disposición resulta ser costosa (He et al., 2013). Hasta ahora las recomendaciones gubernamentales de acuerdo con el Decreto 1076 de 2015 indican que el piscicultor debe reducir los residuos generados a través de otras aplicaciones y en caso de no poder hacerlo sugieren que las mortalidades y los desechos biológicos deben ser incinerados o enterrados en fosas de dos metros de profundidad y cubiertos con capas de cal, para evitar el crecimiento de microorganismo y por ende la dispersión de enfermedades (DANE, 2014; Fedeaqua, 2015); por esta razón es conveniente considerar el uso de los residuos de una forma más eficiente.

Las escamas de pescado presentan contenidos de proteínas entre 41%-84% (Huang et al., 2016) mientras que los esqueletos oscilan entre 14%-67% (Chuesiang & Sanguandeeikul, 2015; Hemung & Sample, 2013). Debido a su alto contenido proteico, las escamas y esqueletos podrían ser utilizados para la obtención de proteínas y péptidos funcionales como en el caso de péptidos antioxidantes, antihipertensivos, antimicrobiales, anticoagulantes (Harnedy & FitzGerald, 2012), con unión a calcio (Chen et al., 2014) o antitumorales (Benjakul et al., 2014).

Teniendo en cuenta el interés actual por encontrar proteínas y péptidos funcionales con aplicación en nutraceutica, en el presente trabajo se evaluó la obtención de péptidos funcionales a partir de escamas y esqueletos de tilapia roja (*Oreochromis spp.*), dada la importancia comercial de dicha especie en la producción piscícola en Colombia.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Evaluar el potencial de generación de péptidos bioactivos a partir de escamas y/o esqueletos de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) mediante procesos de hidrólisis.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la temperatura, el tiempo de hidrólisis y la concentración de NaOH en la hidrólisis alcalina sobre la recuperación de proteínas provenientes de escamas y/o esqueletos de tilapia roja (*Oreochromis spp.*)
- Determinar las condiciones de operación (tipo de enzima, relación enzima-sustrato, concentración de sustrato, temperatura, pH y tiempo de hidrólisis) en la hidrólisis enzimática de proteína de escamas y/o esqueletos de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) en un reactor batch de 500 mL para la obtención de péptidos con actividad biológica.
- Identificar los péptidos o hidrolizados con actividad biológica obtenidos por hidrólisis enzimática de escamas y/o esqueletos de tilapia roja (*Oreochromis spp.*).
- Escalar la hidrólisis enzimática a un reactor batch de 7.5 L para la obtención de péptidos con actividad biológica a partir de proteína proveniente de escamas y/o esqueletos de tilapia roja (*Oreochromis spp.*).
- Implementar el uso de membranas para la purificación de los péptidos bioactivos obtenidos por hidrólisis enzimática de escamas y/o esqueletos de tilapia roja (*Oreochromis spp.*).

MARCO TEÓRICO

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Tilapia roja (*Oreochromis spp.*)

En los últimos años la industria piscícola ha presentado un significativo crecimiento a nivel global, siendo Colombia el décimo productor de tilapia roja en el mundo (FAO, 2020), la cual representa el 62% de la producción piscícola nacional (DANE, 2014). De acuerdo con FAO, 2020 la tilapia es un pez nativo de África que ha sido introducido en muchos países donde ha sido cruzado para obtener diferentes especies como es el caso de la tilapia roja, la cual es un híbrido resultante del cruce de las especies tilapia mossambica, tilapia hornorum, tilapia nilótica y tilapia aurea, por su tonalidad roja, tiene una mayor aceptación en diversos mercados. En la figura 1 se muestra la tilapia roja.

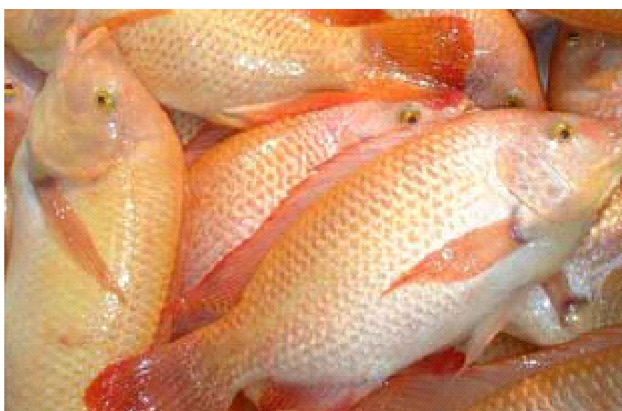


Figura 1. Tilapia roja (*Oreochromis spp.*) tomado de DANE, 2014

El cultivo de tilapia es principalmente en estanques, jaulas o arrozales inundados. Esta especie se reproduce con facilidad, consume una gran variedad de alimentos y tolera aguas con bajas concentraciones de oxígeno disuelto (Bocek, 2015). Los estanques de reproducción deben tener un área adecuada para la recolección de alevines y cosecha, estos estanques por lo general son exteriores para la fase de maduración de reproductores y desove (Echavarría et al., 2016).

La manera en la que ocurre la reproducción natural de la tilapia depende de la especie, en tilapia azul (*Oreochromis aureus*), tilapia mosambica (*Oreochromis mossambicus*) y tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) el macho fertiliza los huevos depositados por la hembra en el

suelo y luego ésta los recoge y los incuba en su boca hasta que eclosionan. Mientras que para el caso de tilapia de pecho rojo (*Coptodon rendalli*) y tilapia de vientre rojo (*Coptodon zilli*) los huevos son depositados e incubados en agujeros excavados por el macho y la hembra. Los padres cuidan de sus huevos y larvas (pececillos recién nacidos) pero no los protegen en sus bocas (Bocek, 2015).

2.2 Subproductos piscícolas

Los residuos de origen animal son constituidos principalmente por materia orgánica y agua, eso hace que sea de fácil deterioro, además sufren cambios enzimáticos rápidos durante su almacenamiento y transporte. Sin embargo, estos residuos son ricos en nutrientes que pueden generar productos de alto valor agregado (Shen et al., 2019).

El proceso de sacrificio de la tilapia entera consta de varias etapas: insensibilización con hielo, descamado, eviscerado, lavado, empaque y conservación. Para el caso del fileteo luego del eviscerado se considera la remoción de hueso. En la figura 2 se observan los principales subproductos: piel, escamas, espinas, esqueletos, vísceras y cabezas (Benjakul et al., 2019; Echavarría et al., 2016).

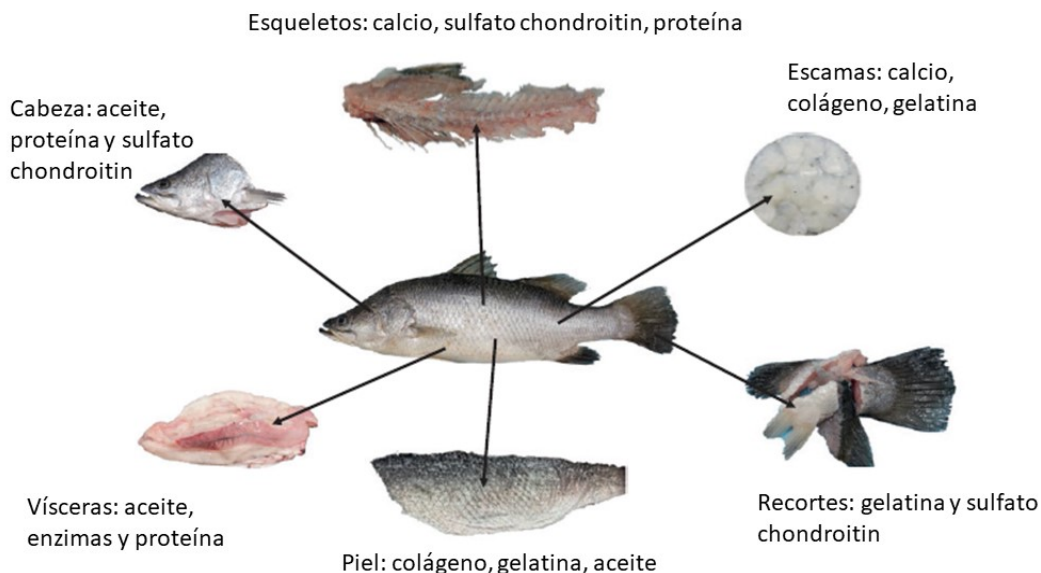


Figura 2. Subproductos de pescado y productos derivados. Tomado de Benjakul et al., (2019).

La disposición de algunos de estos residuos no es ambientalmente adecuada ya que las vísceras se mezclan con los lodos de las trampas de grasas en canecas plásticas. Así mismo las escamas y esqueletos son almacenadas en costales a la espera de una disposición adecuada o aprovechamiento (Echavarría et al., 2016).

2.2.1 Escamas

Las escamas son elementos estructurales de los peces, gracias a su estructura física y composición química, tienen diversas formas y tamaños, lo cual les posibilita la protección mecánica y antibacteriana, además de poder ser un camuflaje. Por otro lado, las escamas son de vital importancia para el movimiento dado que ayudan a crear un flujo laminar alrededor del cuerpo del pez (Ehrlich, 2014).

Los tipos de escamas de pescado se clasifican según la especie de pez: placoides (peces cartilagosos) y cosmoides, ganoides y cicloides (peces óseos). En el caso de la tilapia son cicloides las cuales son casi redondas con bordes lisos, están ligeramente calcificadas y adquieren una disposición imbricada donde la epidermis se pliega para rodearlas. Las escamas cicloides constan de tres capas las cuales son matrices de colágeno mineralizadas con diferentes espesores (Gil-Duran et al., 2016). En la figura 3 se observar las escamas de tilapia roja secas.



Figura 3. Escamas de tilapia roja

El principal mineral presente en las escamas es la hidroxiapatita, que consiste en un hidroxilado de los minerales de fosfato conocidos como apatitas (fórmula química HA: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Ahmad Fara & Abdullah, 2016).

Además del colágeno, las escamas están constituidas por proteínas como las queratinas que son un grupo de proteínas insolubles y formadoras de filamentos producidas en ciertas células de vertebrados; para el caso de las escamas son queratinas beta (Wang et al., 2017). Así mismo, las mucinas son componente importante de las escamas, las cuales son glucoproteínas extracelulares cuyos pesos moleculares varían de 0.5 a 20 MDa (Wang et al., 2020). En la figura 4 se observa la microestructura de las escamas donde se detallan las fibras de colágeno.

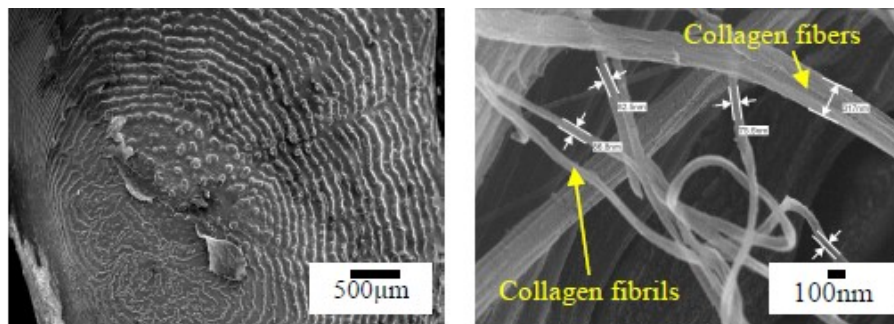


Figura 4. Microestructura de escamas de pescado. Tomado de Ahmad Fara & Abdullah, 2016

2.2.2 Esqueletos

El sistema esquelético de los vertebrados marinos incluye cartílago y hueso, los cuales pueden variar en densidades y composición, lo que se relaciona con adaptaciones de flotabilidad y locomoción (Ehrlich, 2014). En la figura 5 se observan los esqueletos de tilapia roja. La principal propiedad mecánica de los huesos es la rigidez, por lo tanto, sus principales componentes son colágeno, mucopolisacáridos y otras sustancias inorgánicas como el calcio presente en la hidroxiapatita (65%) (Ehrlich, 2014; Shen et al., 2019; Zhang et al., 2018)

Los principales oligoelementos básicos presentes en los huesos son silicio, flúor, zinc, estroncio, magnesio, boro, cobre, sodio, potasio, cloro. Respecto a la proteína, es principalmente colágeno I, III, V y XXIV. Entre ellos, el colágeno tipo I es la proteína más abundante que representa el 97% (Zhang et al., 2018).



Figura 5. Esqueletos de tilapia roja

2.3 Hidrólisis de proteínas

Existen varios métodos para la obtención de péptidos bioactivos, los más comunes son: síntesis artificial, hidrólisis de proteínas química y enzimática (Bechaux et al., 2019)

La síntesis artificial puede ser de dos maneras, la primera por expresión de un plásmido, técnica que es usada principalmente para sintetizar péptidos grandes, es una técnica robusta que requiere mucho tiempo y personal altamente calificado. La otra opción es la síntesis química, se inicia con un aminoácido y se adicionan los demás aminoácidos hasta completar el péptido deseado, este método permite la síntesis rápida de péptidos cortos pero su escalado es difícil (Bechaux et al., 2019).

La hidrólisis de proteínas consiste en el rompimiento de enlaces peptídicos por medio de procesos químicos o enzimáticos. Los procesos químicos pueden ser hidrólisis ácida o alcalina, son de bajo costo, pero son inespecíficos, poco reproducibles y conducen a la desnaturalización de los aminoácidos. Por otro lado, la hidrólisis enzimática es más costosa pero no deteriora los aminoácidos (Tavano, 2013).

La hidrólisis alcalina ha sido usada por diversos autores para la obtención de péptidos con efectos bioactivos o funcionales. Como por ejemplo se tiene la obtención de péptidos con actividad antihipertensiva y antioxidante de filetes de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*)

(Raghavan & Kristinsson, 2008, 2009) y péptidos quelantes de calcio de tilapia nilótica completa (*Oreochromis niloticus*) (Charoenphun et al., 2013).

Para el caso de la hidrólisis enzimática, varios autores han estudiado la obtención de péptidos bioactivos usando procesos con diferentes enzimas como Alcalase® 2.4 L; péptidos con actividad antioxidante (Benjakul et al., 2014; Chen et al., 2014; Cheung et al., 2012; Najafian & Babji, 2014), actividad anticoagulante (Nasri et al., 2012) quelantes de calcio (Charoenphun et al., 2013). Otra de las enzimas de interés es la Flavourzyme® 500 L, con la que se han obtenido péptidos con actividad antioxidante (Cheung et al., 2012; Chuesiang & Sanguandeeikul, 2015), actividad antihipertensiva (Zarei et al., 2015) y quelante de calcio (Nie et al., 2014).

2.3.1 Hidrólisis alcalina

La hidrólisis alcalina consiste en tratar las proteínas con una solución básica, la cual es normalmente NaOH, con lo que se facilita la penetración en el caso de sustratos de estructura rígida (Sanmartín et al., 2009; Schmidt et al., 2016). La extracción de la proteína es eficiente cuando el pH de la solución es superior al punto isoeléctrico de la proteína de interés (Chomnawang & Yongsawatdigul, 2013), tal como Surasani, (2018) encontró que el pH 13 era óptimo para la solubilización de las proteínas de pescado debido a que están constituidas principalmente por miosina cuyo punto isoeléctrico es pH 5 a 5.5. El incremento de la solubilidad podría deberse a las repulsiones electrostáticas generada grupos ionizables con valores de pKa en esos pH (Nolsøe & Undeland, 2009).

Las proteínas permanecen unidas en solución por interacciones débiles proteína-proteína, las cadenas laterales pueden asumir diferentes cargas de acuerdo con el pH, lo que puede generar fuerzas repulsivas entre las proteínas, haciendo que se separen, de este modo se favorecen las interacciones proteína-agua consiguiendo que la proteína sea soluble en el medio acuoso (Ver figura 6) (Surasani, 2018).

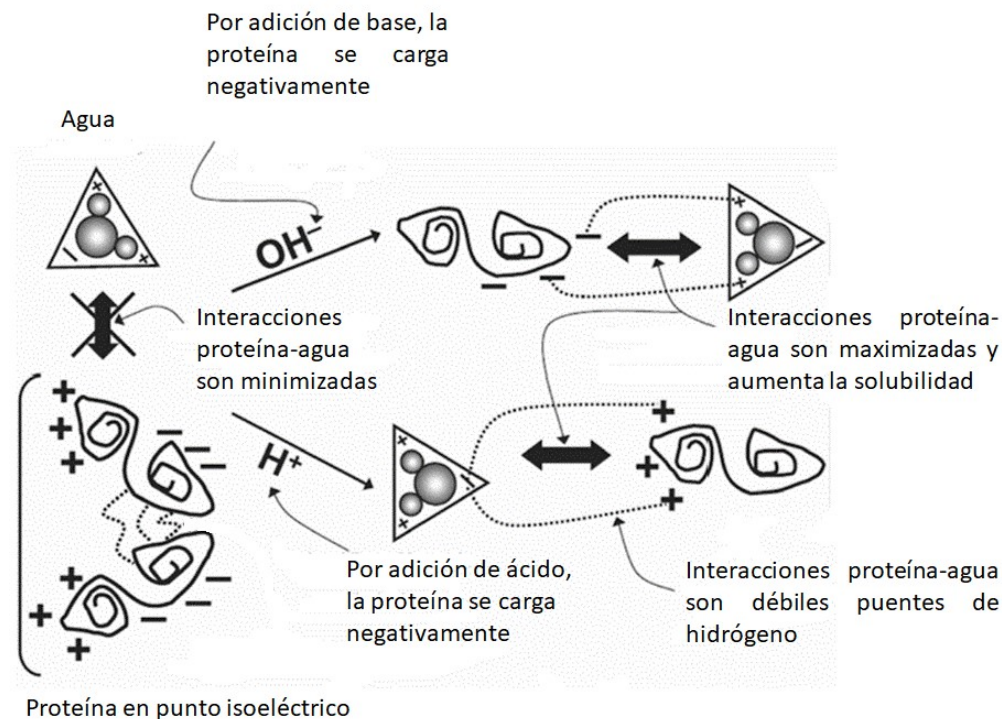


Figura 6. Cargas de las proteínas en el proceso de solubilización. Tomado de Surasani, 2018

La hidrólisis alcalina de proteínas presenta ciertas ventajas en comparación con la hidrólisis ácida de proteínas, ya que el ácido daña aminoácidos como la oxidación de cisteína y metionina, destruye parcialmente serina y treonina y transforma asparagina y glutamina, causando un hidrolizado de menor calidad nutricional o la formación de sustancias tóxicas (Anal et al., 2013; Khueychai et al., 2018). Sin embargo, la hidrólisis alcalina puede llegar a generar la formación de compuestos indeseables lisioaláina, ornitinoalanina, lantionina y β -amino alanina (Anal et al., 2013)

2.3.2 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática consiste en el fraccionamiento de las proteínas en péptidos usando enzimas específicas conocidas como proteasas. Este procedimiento tiene ventajas con respecto a la hidrólisis enzimática como son altos rendimientos, alta selectividad y baja contaminación, sin embargo, también hay desventajas como costo de las enzimas y tiempos largos de proceso (He et al., 2013).

El proceso catalítico que ocurre en la hidrólisis enzimática se divide en dos pasos. Primero la enzima (E) debe aproximarse al sustrato (S) y unirse formando el complejo sustrato-enzima (ES). En segundo lugar, el complejo ES convierte el sustrato en el producto (PR). Cada una de estas reacciones tiene su propia velocidad como se describe en la ecuación (1) (Mc Auley, 2019).



La hidrólisis enzimática de proteínas es un proceso específico que se lleva a cabo en condiciones moderadas de pH y temperatura, esto hace que sea de fácil control usando el grado de hidrólisis. El producto obtenido es hidrolizado de proteínas constituido por péptidos por lo general entre 2 y 20 aminoácidos (Zamora-Sillero et al., 2018).

Varias proteasas comerciales han sido usadas para la producción de hidrolizados, incluyendo tripsina, quimotripsina, pepsina, Alcalase® 2.4 L, Flavourzyme® 500 L, properasa E, pronasa, colagenasas, bromelina y papaína (Najafian & Babji, 2014; Wang et al., 2015). Los factores que afectan la hidrólisis enzimática son: temperatura, pH, tipo de enzima, concentración de enzima, concentración de sustrato, cofactores, coenzimas y tiempo de hidrólisis (Wang et al., 2015).

2.3.2.1 Medición de grado de hidrólisis

De acuerdo con Nielsen et al., (2001), para monitorear la hidrólisis se usa el grado de hidrólisis (GH) que se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos (h) respecto al número total de enlaces peptídicos (h_{TOT}) en la proteína intacta, de acuerdo con la ecuación (2).

$$GH(\%) = \frac{h}{h_{TOT}} \times 100 \quad (2)$$

Existen diversos métodos para determinar el GH, los más utilizados son pH-stat (Adler-Nissen, 1986), ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) (Adler-Nissen, 1979), O-ftaldialdehído

(OPA) (Nielsen et al., 2001). La diferencia radica en el principio que se usa para medir los enlaces peptídicos rotos (h), dado que el valor h_{TOT} se determina a partir del aminograma (Wubshet et al., 2019).

Durante la hidrólisis del enlace peptídico, se liberan un grupo carboxilo y un grupo amino. En solución acuosa estos grupos estarán más o menos ionizados dependiendo del pH (Adler-Nissen, 1979). A pH neutro o alcalino, los grupos carboxilo están completamente desionizados y se produce el intercambio de protones entre el grupo carboxilo y el grupo amino. A pH alcalino, los grupos amino también estarán parcial o totalmente desionizados dependiendo del pH del medio de reacción y del aminoácido en cuestión, ya que el pK del grupo amino N-terminal de aminoácidos libres oscila entre 9 a 10.8. Los protones libres resultantes causan una disminución en el pH de la mezcla de reacción y se requiere la adición de base para mantener el pH constante. La cantidad de base requerida tiene una relación directa con la cantidad de enlaces peptídicos hidrolizados, y se puede usar para estimar el GH. Desafortunadamente, la relación entre el GH y el consumo de base no es simple y depende de una serie de variables, incluyendo pK del grupo α -amino liberado, temperatura de la mezcla de reacción y longitud de la cadena peptídica (Adler-Nissen, 1986). La relación entre el volumen de base gastada y el GH ha sido descrita por Adler-Nissen, 1979 en la ecuación (3). En la figura 7 se muestra las especies químicas que se generan el proceso de hidrólisis de proteínas (Mat et al., 2018)

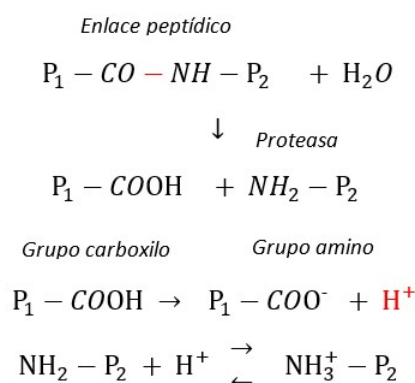


Figura 7. Representación de la hidrólisis de proteínas a $pH > 7$

$$GH (\%) = \frac{B N_B}{M_p \alpha h_{TOT}} \times 100 \quad (3)$$

Donde B es el volumen consumido de base en L para mantener el pH constante, M_p es la masa de la proteína en kg, N_B es la concentración de la base y α es el grado de disociación de los grupos aminos liberados en la reacción. Se empleó un h_{TOT} de 8.85 Eqv/Kg que ha sido obtenido a partir del aminograma como se describe más adelante en la metodología, mientras que α y pK se calcularon con las ecuaciones 4 y 5 respectivamente, donde T es la temperatura (K) (Valencia et al., 2015).

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{(1+10^{pH-pK})} \quad (4)$$

$$pK = 7.8 + \frac{(298 - T)}{298 * T} * 2400 \quad (5)$$

De acuerdo con el valor obtenido del GH es posible predecir si el hidrolizado de proteína tendrá principalmente propiedades biológicas o funcionales, para el caso de $GH < 10\%$, se espera que los hidrolizados puedan presentar propiedades funcionales como emulsificantes o espumantes, mientras que para $GH > 10\%$ es posible que los hidrolizados tengan propiedades biológicas como antioxidantes, quelantes de hierro y calcio, antihipertensivos, anticoagulantes, entre otras (Agyei et al., 2016; Beaubier et al., 2019).

2.3.2.2 Cinética enzimática

Una manera de optimizar la hidrólisis enzimática es conocer su cinética, la cual puede ser modelada por medio de la ecuación de Michaelis-Menten (6):

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (6)$$

Donde V es la velocidad de reacción; K_M y V_{max} representan parámetros cinéticos de la reacción enzimática. K_M es la concentración de sustrato inicial donde la velocidad es la mitad de la velocidad máxima, esto muestra la afinidad de la enzima por el sustrato y V_{max} representa la velocidad máxima asintótica en el caso de enzima saturada con sustrato (Paar et al., 2019). Para calcular estos parámetros cinéticos se emplea la linealización de Lineweaver-Burk de acuerdo con la ecuación (7).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{1}{S} \right) + \frac{1}{V_{max}} \quad (7)$$

Graficando $1/V_0$ y $1/S$ se pueden calcular K_M/V_{max} como la pendiente y $1/V_{max}$ como el intercepto de la recta (Valencia et al., 2014).

2.3.2.3 Proteasas

Las proteasas pertenecen a la clase de enzimas conocidas como hidrolasas, que catalizan la ruptura de enlaces peptídicos en presencia de agua. Hay diferentes clases de proteasas, dependiendo del aminoácido que sirva como nucleófilo en el sitio activo: serina, treonina, cisteína, aspartato, ácido glutámico y metaloproteasas (Wubshet et al., 2019).

2.3.2.3.1 Alcalase® 2.4 L

Alcalase® 2.4 L es una proteasa comercial obtenida de la fermentación de *Bacillus licheniformis*, es una serina endopeptidasa no específica, es decir rompe al interior de la cadena, teniendo en cuenta que en su sitio activo el aminoácido serina actúa como nucleófilo (Maqsoudlou et al., 2019; Shen et al., 2019). Además, es soluble en agua y está disponible en grado alimenticio a bajo costo, lo cual la hace una enzima ampliamente usada en la industria alimenticia para extraer proteínas vegetales y animales con propiedades funcionales y nutricionales (Shen et al., 2019). De acuerdo con la información técnica del proveedor

Novozymes, el pH óptimo de la alcalasa está entre 7-9 y la temperatura entre 55-70°C, en función del sustrato.

2.3.2.3.2 Flavourzyme® 500 L

Flavourzyme® 500 L es un complejo de peptidasas obtenido de la fermentación de *Aspergillus oryzae* y se ha usado ampliamente para la hidrólisis de proteínas bajo condiciones neutras o ligeramente ácidas (Vidal et al., 2018). Flavourzyme® 500 L es una mezcla de endo y exo peptidasas que principalmente rompen enlaces peptídicos al final de la cadena polipeptídica (Shen et al., 2019). De acuerdo con la información técnica del proveedor Novozymes, el pH óptimo de la alcalasa está entre 5-7 y la temperatura entre 55-70°C, en función del sustrato.

Cuando se incrementa la concentración de enzima y el tiempo de hidrólisis, el grado de hidrólisis aumenta generando péptidos más pequeños con menor peso molecular y por lo tanto mayor actividad antioxidante (Maqsoudlou et al., 2019).

Algunos autores han reportado que la Alcalase® 2.4 L es una enzima con la que han obtenido grados de hidrólisis mayores, péptidos con mayor actividad antioxidante y péptidos más resistentes a las enzimas digestivas en comparación con Flavourzyme® 500 L (Shen et al., 2019).

2.4 Purificación de péptidos

La purificación de los péptidos bioactivos impacta directamente la potencia de sus actividades biológicas Agyei et al., (2016), algunos de los métodos más usados para la purificación de péptidos son: filtración por membrana y métodos cromatográficos. La filtración por membrana permite obtener péptidos de diferentes pesos moleculares mientras que los métodos cromatográficos es una técnica para obtener péptidos con diferente naturaleza química. (Acquah et al., 2019).

El fraccionamiento de proteínas usando membranas se ha convertido en un método muy usado en comparación con los métodos cromatográficos por su alto rendimiento, bajo costo y facilidad para el escalado (Acquah et al., 2019; Saxena et al., 2009). Las membranas de ultrafiltración son de tamaños de poro 1 a 100 kDa lo cual permite la retención de proteínas y otras macromoléculas (Acquah et al., 2019)

Las actividades biológicas de los hidrolizados de proteína son afectadas por su peso molecular (Gomez-Guillen et al., 2011; C. Wang et al., 2015). El tamaño de la cadena peptídica afecta la eficiencia fisiológica de los péptidos bioactivos, es decir, péptidos más pequeños <7 aminoácidos (PM <700–800 Da) son los más activos, luego están los de cadena media 7–25 aminoácidos (PM 800–3000 Da) y los menos activos son los de cadena larga (Capriotti et al., 2016). Varios autores reportan el uso de membranas para purificación de los péptidos obtenidos por procesos de hidrólisis (Chabeaud et al., 2009; Chen et al., 2014; Girgih et al., 2015; Liu et al., 2012; Picot et al., 2010; Wu et al., 2015)

La cromatografía es una de las tecnologías más usadas para la separación de compuestos naturales, su eficiencia está determinada por la interacción de estos compuestos con interacción con la fase estacionaria (Qilong et al., 2013); la fase móvil es determinante para la elución del componente, es decir, buffer con pH cercano a siete son las adecuadas para mantener la actividad biológica de los compuestos (Agyei et al., 2016; Jungbauer, 2005).

Se han evaluado técnicas cromatográficas para purificar péptidos bioactivos a partir de residuos piscícolas tales como intercambio iónico y fase reversa en aleta de salmón (*Salmo sp.*) (Ahn et al., 2014) y fase reversa en piel de pez cabeza de serpiente (*Channidae sp*) (Ghassem et al., 2014), piel de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) (Yufeng Zhang et al., 2012), piel de Caballa (*Magalaspis cordyla*) (Kumar et al., 2012).

2.5 Péptidos antioxidantes

Los péptidos bioactivos son fragmentos específicos de proteínas que tienen un efecto positivo en la salud, estos son inactivos dentro de las proteínas nativas y requieren la liberación

por medio de hidrólisis para potencializar sus funciones de antioxidantes, anhipertensivos, anticoagulantes, antidiabéticos, antimicrobianos, entre otros (Halim et al., 2016).

Los procesos de hidrólisis de las proteínas afectan sus propiedades fisicoquímicas como peso molecular, distribución de carga, punto isoeléctrico e hidrofobicidad. Es decir, los péptidos hidrófobos y catiónicos por lo general son antimicrobianos, los péptidos hidrofóbicos y con grupos sulfhídricos son antioxidantes (Agyei et al., 2016).

Usando hidrolizados de subproductos piscícolas se han encontrado péptidos con actividad antioxidante (Harnedy & FitzGerald, 2012; Khora, 2013; Kim & Wijesekara, 2010).

Los antioxidantes tienen efecto positivo en la salud humana ya que protegen el cuerpo del deterioro provocado por los radicales libres y las especies de oxígeno reactivo ROS (reactive oxygen species) (Lorenzo et al., 2018; Ngo et al., 2012). Las ROS pueden contribuir a la oxidación de componentes como el DNA, proteínas y lípidos dejando enfermedades neurodegenerativas, inflamatorias, cardiovasculares, diabetes y cáncer (Liu et al., 2017; Ngo et al., 2012; Power et al., 2013). Péptidos derivados de hidrolizados de proteína de especies marinas como peces, mejillones, microalgas y calamares presentan actividad como inhibidores de este tipo de especies químicas (Nasri, 2019).

La secuencia de los péptidos es determinante para que su funcionalidad, algunos autores reportan que el extremo N-terminal de las secuencias peptídicas en algunas especies de peces eran aminoácidos como fenilalanina, alanina y prolina, tirosina, histidina y valina, esto hace que puedan ser donantes de electrones y reaccionen con los radicales libres, lo que los convierte en sustancias más estables que detienen las reacciones en cadena (Villamil et al., 2017).

Los péptidos con actividad antioxidante han sido obtenidos a partir de diversos residuos tales como: piel de carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*) (Wu et al., 2015), cobia (*Rachycentron canadum*) (Chow & Yang, 2011), tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) (Yufeng Zhang et al., 2012), jurel (*Magalaspis cordyla*) y corvina (*Otolithes ruber*) (Kumar et al., 2012), barracuda (*Sphyraena barracuda*) y sable del atlántico (*Lepturacanthus savala*) (Nazeer et al., 2011).

Los metales de transición como el hierro reaccionan con los peróxidos siendo donadores de electrones formando radicales alcoxilo, por lo tanto, la quelación de este metal retrasaría los procesos de oxidación y la formación de este tipo de ROS (Kumar et al., 2012). La actividad de los péptidos quelante de metales también está asociada a la estructura y peso molecular, los aminoácidos predominantes en estos péptidos son glicina, histidina, prolina y arginina, siendo los dos primeros los que hacen que la actividad sea mayor (Chel-Guerrero et al., 2020).

Los péptidos con actividad quelante de hierro han sido obtenidos a partir de diversos residuos tales como: músculo de pez león (*Pterois volitans*) (Chel-Guerrero et al., 2020), hidrolizado de proteína de bacalao (*Gadus morhua*) (Sabeena Farvin et al., 2014), peces completos de sardina, jurel, boga, pintarroja y aligote (García-Moreno et al., 2014), escamas de lubina, tilapia, mújol y sabalote (Huang et al., 2015), piel de jurel (*Magalaspis cordyla*) y diente de tigre (*Otolithes ruber*) (Kumar et al., 2012), piel de bacalao (W. Wu et al., 2017).

2.6 Escalado de proceso de hidrólisis

El escalado de procesos es la herramienta que permite llevar los procesos de escala de laboratorio a la escala industrial (Monsalve-bravo et al., 2014; Xia et al., 2015). Normalmente, el proceso de escalado se basa en el llamado "principio de similitud química, biológica y geométrica", donde las diferencias en las propiedades entre los dos sistemas se mantienen en una proporción constante, y la reacción se lleva a cabo en las mismas condiciones. En algunos casos, solo se utiliza similitud geométrica, pero en otros casos, es necesario para hacer uso del análisis dimensional (Grimaldos & Zapata. 2020)

Uno de los criterios de escalado más empleado es mantener constante el número de Reynolds (Re) entre el modelo (m) y el prototipo (p) usando la ecuación 8, la cual permite hacer los cálculos de la velocidad de agitación en el prototipo (p) (Gelves et al., 2013; Palmqvist et al., 2016).

$$Re_M = Re_p \rightarrow \left(\frac{N \cdot D_i^2 \cdot \rho}{\mu} \right)_m = \left(\frac{N \cdot D_i^2 \cdot \rho}{\mu} \right)_p \quad (8)$$

Son escasos los trabajos en los que se evalúen la obtención de péptidos con actividad biológica a partir de escamas y esqueletos de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) a escala industrial (Harnedy & FitzGerald, 2012). Lo que refleja la necesidad de trabajos en el tema de escalado de los sistemas de reacción que permitan evaluar aspectos como consumo de energía, productividad, eficiencia, purificación y separación de productos, entre muchos otros.

METODOLOGIA

3 METODOLOGÍA

3.1 Pretratamiento de la materia prima

Las escamas y los esqueletos fueron suministrados por Piscícola El Gaitero (Municipio de San Jerónimo, departamento de Antioquia, Colombia), lavados y desinfectados con hipoclorito de sodio 0.2 mg/L, para almacenarlos en bolsas de polietileno a -20°C hasta su uso. Para el caso de los esqueletos fue necesario hacer tres lavados en agua a 90°C para remover la grasa. Previo a los procesos de hidrólisis, los sustratos fueron sometidos a secado a 60°C en una estufa de secado por convección (Thermo Fisher Scientific, EE.UU), por 24 h y reducción de tamaño hasta 850 µm por medio de un molino de tornillo sin fin (Corona, Colombia).

3.2 Reactivos e insumos

Para la hidrólisis enzimática, se utilizó Alcalase® 2.4 L grado alimenticio (Novo Nordisk Co., Bagsværd-Dinamarca) y Flavourzyme® 500 L obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis-EE.UU). Los reactivos ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS), 2,4,6-Tri-2-piridil-s-triazina (TPTZ), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox), sal sódica de fluoresceína, Crocin, 2,2'-azobis[2-metilpropionamida], diclorhidrato (AAPH, >98%), Hidrato de sal monosódica del ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-p,p'-disulfónico (FerroZina™), caseína grado técnico, O-ftalaldehido (OPA), Ácido 3-mercaptopropionico, estándar de aminoácidos grado analítico, 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC) y Chelex® 100 sodio, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis- EE.UU.). Medio Dulbecco's modificado de Eagle's (DMEM + GlutaMAX™), aminoácidos no esenciales, HEPES, solución de antibióticos (penicilina-estreptomicina), suero fetal bovino (SFB), buffer fosfato salino (BFS) y solución tripsina-EDTA (2.5 g/L trypsin and 0.2 g/L EDTA), fueron obtenidos de Gibco (Scotland-UK). Metanol, acetonitrilo y ácido trifluoroacético grado HPLC, Folin-Ciocalteu y los medios de cultivo para microbiología fueron obtenidos de Merck (Darmstadt-Alemania). Los demás reactivos y solventes fueron de grado analítico estándar.

3.3 Métodos analíticos

A continuación, se describen las técnicas analíticas que se aplicaron para evaluar las hidrólisis planteadas y la purificación de los péptidos de interés.

3.3.1 Análisis proximal

La composición proximal de las escamas y los esqueletos se realizó usando el método AOAC 930.15, 990.03, 920.38, 942.05, para humedad, proteína, grasa y cenizas, respectivamente (Latimer, 2012).

3.3.2 Actividad enzimática

La actividad catalítica de la Alcalase® 2.4 L y Flavourzyme® 500 L se determinó mediante un análisis estándar para proteasas usando caseína como sustrato (Cupp-Enyard & Aldrich, 2008). En este análisis, una unidad de actividad es representada por una producción de color equivalente a 1 μmol de tirosina por min a pH 7.5 y 37°C. Para esto, una alícuota de 100 μL de enzima fue incubada con 500 μL de solución de caseína 0.65 %, durante 10 min a 37°C. La reacción se detuvo adicionando 500 μL de solución de ácido tricloroacético (110 mM) y la mezcla se centrifugó, para tomar 200 μL del sobrenadante y mezclarlos con 500 μL de Na_2CO_3 0.5 M y 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu. Esta última solución fue incubada a 37°C por 30 min y la absorbancia se leyó a 660nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Scientific™, Massachusetts- EE.UU.). Como patrón se empleó una curva estándar de solución de tirosina entre 0-200 mg/L (Cupp-Enyard & Aldrich, 2008).

3.3.3 Cuantificación de proteína por Biuret

La concentración de proteína soluble en los hidrolizados y sus fracciones fue determinada por el método de Biuret (Chang & Zhang, 2017) la absorbancia fue leída a 540 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Scientific™, Massachusetts- EE.UU.) usando albumina de suero bovina entre 0 y 10 g de proteína/L para la elaboración de la curva patrón.

3.3.4 Composición total de aminoácidos

La determinación de los aminoácidos presentes en escamas (material seco y sus hidrolizados) y los esqueletos fue desarrollado de acuerdo con Cigić et al., (2008) con algunas modificaciones. El método se basa en la reacción de derivatización precolumna usando O-ftalaldehído (OPA) para aminoácidos primarios y 9-fluorenil-metil-cloroformiato (FMOC) para aminoácidos secundarios (Henderson & Brooks, 2010). Los aminoácidos fueron determinados luego de la hidrólisis con HCl 6 N y 0.1% de fenol, durante 24h a 110 °C. El análisis por HPLC fue usando Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU), con detector UV/VIS con arreglo de diodos DAD, operado con columna analítica de 5 µm, ZORBAX Eclipse AAA-C18, 4.6 x 75mm (Agilent, EE. UU). Los aminoácidos fueron eluidos usando un gradiente lineal de la fase móvil A (Buffer NaH₂PO₄ 40mM a pH 7.8) y fase móvil B (metanol: acetonitrilo: agua, 50:50:10) (Henderson & Brooks, 2010).

3.4 Selección del sustrato de trabajo

Para seleccionar el sustrato de trabajo se realizó la hidrólisis alcalina y enzimática de las escamas y esqueletos bajo las siguientes condiciones.

Hidrólisis alcalina: las hidrólisis se llevaron a cabo en un reactor de vidrio con 500 mL usando NaOH 2M, la concentración de sustrato fue 4.8% p/p y la temperatura 60°C. El sistema de reacción se mantuvo bajo agitación constante a 500 rpm usando un agitador magnético durante 6 h estos valores son de acuerdo con investigaciones previas del grupo Nutrición y Tecnología de Alimentos (Quintero & Zapata, 2017). Los hidrolizados se centrifugaron a 3500 rpm durante 20 min a temperatura ambiente para remover el material insoluble y se conservó el sobrenadante. El criterio de selección fue la mayor concentración de proteína soluble, la cual fue determinada por el método de Biuret.

Hidrólisis enzimática: las hidrólisis se llevaron a cabo en un reactor de vidrio con camisa de circulación de agua para regulación de la temperatura, capacidad volumétrica de 1 L y 500 mL de volumen de trabajo. El control de pH y el registro de temperatura se realizaron con un electrodo combinado de vidrio con diafragma esmerilado fijo (temperatura entre 0-80°C),

conectado a un titulador automático Titrando 842 (Metrohm, Suiza), operado por computador (software tiamo 1.2.1). El sistema de reacción se mantuvo en agitación constante de 560 rpm usando un agitador magnético 801 durante 3 h según ensayos previos de la curva de hidrólisis. La concentración de sustrato fue 8 g/L, la concentración de la enzima 0.4 g/L, el pH fue 8 y la temperatura 55°C, estos valores son de acuerdo con investigaciones previas del grupo Nutrición y Tecnología de Alimentos (Gómez et al., 2013). Los hidrolizados se centrifugaron a 3500 rpm durante 20 min a temperatura ambiente para remover el material insoluble y se conservó el sobrenadante. Los criterios de selección fue el grado de hidrólisis (GH) descrito por Adler-Nissen, 1986, según la ecuación (3) y la mayor concentración de proteína soluble, la cual fue determinada por el método de Biuret.

3.5 Hidrólisis alcalina

Las escamas de tilapia roja fueron sometidas a hidrólisis alcalina, proceso que fue optimizado de acuerdo con las variables más importantes del proceso que son concentración de NaOH, temperatura, porcentaje de escamas y tiempo.

3.5.1 Efectos de la concentración de NaOH, la temperatura y el porcentaje de escamas sobre la hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja.

De acuerdo con Quintero & Zapata, (2017), se llevó a cabo un diseño factorial central compuesto para evaluar los efectos de los factores, concentración de NaOH (N) (0.5 a 2 M), temperatura (T) (40 a 60°C) y porcentaje de escamas (S) (2.5 a 7.5% p/v) límites fueron determinados por estudios previos del grupo Nutec de la Universidad de Antioquia, el sistema de reacción se mantuvo bajo agitación constante a 500 rpm usando un agitador magnético durante 3 h. Los hidrolizados se centrifugaron a 3500 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. Las variables de respuesta fueron proteína (P) (g/L) medida por Biuret, capacidad antioxidante por ABTS, FRAP y AQH

3.5.2 Efecto del tiempo sobre la hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja.

Se evaluó el tiempo de la hidrólisis alcalina en las condiciones óptimas de concentración de NaOH, la temperatura y el porcentaje de escamas determinadas en la sección 3.5.1, los tiempos fueron 2, 4 y 8 h y las variables evaluadas fueron concentración de proteína soluble (P) (g/L) medida por Biuret y capacidad antioxidante medida por ABTS, FRAP y AQH.

3.6 Hidrólisis enzimática

3.6.1 Determinación del número total de enlaces peptídicos

De acuerdo con Adler-Nissen, (1979), es posible calcular el número total de enlaces peptídicos (h_{TOT}) a partir de la concentración de cada uno de los aminoácidos presentes en el sustrato usando las ecuaciones 9 y 10

$$F_i = \frac{[A_i]}{\sum_{i=1}^{18} [A_i]} * PM \quad (9)$$

$$h_{TOT} = \frac{1}{\sum_{i=1}^{18} F_i} * (1 + F_i) * 1000 \quad (10)$$

Donde el aminoácido es i , A_i es la concentración del aminoácido i ($\mu\text{mol/mL}$), PM es el peso molecular del aminoácido i y F_i es la fracción molar del aminoácido i .

3.6.2 Descripción del proceso de hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja.

Se usó un reactor de vidrio con camisa de circulación de agua para regulación de la temperatura, capacidad volumétrica de 1 L y 500 mL de volumen de trabajo. El control de pH y el registro de temperatura se realizaron con un electrodo combinado de vidrio con diafragma esmerilado fijo (temperatura entre 0-80 °C), conectado a un titulador automático Titrando 842 (Metrohm, Suiza), operado por computador (software tiamo 1.2.1). El sistema de reacción se mantuvo en agitación constante de 560 rpm usando un agitador magnético 801 durante 3 h según ensayos previos de la curva de hidrólisis (Metrohm, Suiza) (Gómez et al., 2013). La reacción de

hidrólisis se monitoreo por medio del grado de hidrólisis (GH) descrito por Adler-Nissen, (1986) según la ecuación (3).

Las enzimas fueron inactivadas a 90°C por 10 min. El hidrolizado resultante fue centrifugado a 3500 rpm por 20 min a temperatura ambiente conservando el sobrenadante. La proteína de la materia prima fue determinada por Kjeldahl (3.3.1), mientras que en los hidrolizados fue por Biuret (3.3.3).

3.6.3 Efecto del pH y temperatura sobre la hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja.

Algunos autores han señalado que las condiciones de pH y la temperatura de la hidrólisis dependen del sustrato, así por ejemplo Hamid et al., (2015) reportaron T: 65°C, pH 10 para la hidrólisis de caracol manzana (*Pomacea canaliculata*), Gomez et al., (2019) reportaron T:60°C, pH:10 usando vísceras de tilapia roja (*Oreochromis spp.*), Kang et al., (2018) reportaron T: 59.49°C, pH 9.93 para la hidrólisis de proteína de caballa fina (*Decapterus macrosoma*). Por esta razón, se realizó un diseño central compuesto para cada enzima (Flavourzyme® 500L and Alcalase® 2.4L).

La actividad catalítica fue mantuvo en 0.28 unidades/mL de enzima con el fin de evaluar el efecto del pH y la temperatura sobre las variables respuesta GH y proteína soluble (P) (g/L). La concentración de sustrato fue constante de 8g/L y la concentración de enzima 1.6 g/L. Los rangos de pH para la Alcalase® 2.4 L fueron 7.5-10.4 y para la Flavourzyme® 500 L 7-8.5, la temperatura fue evaluada entre 40.9°C y 69.4°C, en ambas enzimas, estos rangos fueron determinados de acuerdo con ensayos previos de curva de hidrólisis. Para cada diseño fueron 13 corridas aleatorias, 8 puntos del diseño y 5 repeticiones del punto central. Los modelos obtenidos del diseño experimental se sometieron a un proceso de optimización por medio de la metodología de superficies de respuesta (MSR).

3.6.4 Actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos de la hidrólisis con Alcalase® 2.4 L y Flavourzyme® 500 L

Se determinó la actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos en las condiciones óptimas de pH y temperatura para Alcalase® 2.4 L y Flavourzyme® 500 L, se calcularon las

eficiencias expresadas como $\mu\text{mol ET/g prot} \cdot \text{mL enzima}$ y $\% \text{AQH/mL enzima}$, como criterio de selección de la enzima, aquella que permitiera obtener mayores valores fue la seleccionada para los otros procesos de optimización de la hidrólisis enzimática.

3.6.5 Parámetros cinéticos de la hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja usando Alcalase® 2.4 L

Se realizó la curva de saturación de Alcalase® 2.4 L para determinar la concentración de sustrato en la cual la enzima se satura, variando la concentración de sustrato(S) desde 4 g/L hasta 36 g/L, por medio de hidrólisis a las condiciones óptimas de pH y temperatura de la etapa anterior y con volumen de enzima (695 μL), tiempo (15 s) y agitación (560 rpm) constantes, estos rangos fueron determinados de acuerdo con ensayos previos de curva de hidrólisis. De cada curva se obtiene la velocidad inicial (V), de la cual se gráfica el inverso multiplicativo (1/V) contra el inverso multiplicativo del sustrato (1/S) y se obtienen los parámetros cinéticos V_{max} y K_m siguiendo el modelo de Lineweaver-Burk como se muestra en la ecuación 7 (Lin et al., 2017; Valencia et al., 2014).

3.6.6 Efecto de la concentración de sustrato y enzima en la hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja

Luego de encontrar los parámetros cinéticos de la reacción, se lograron definir los valores de los factores concentración de sustrato (S) y enzima (E) para un diseño factorial central compuesto con 5 repeticiones del punto central. El rango de S fue entre 8.8- 45 g/L y el de E 0.4- 5.6 g/L.

3.6.7 Efecto del grado de hidrólisis sobre la actividad antioxidante de los hidrolizados enzimáticos de escamas de tilapia roja

Una vez se encontraron las condiciones óptimas de hidrólisis (pH, T, S y E) se evaluó P y la actividad antioxidante por ABTS, FRAP, ORAC y AQH en función del GH, usando valores de 2, 7, 12, 17 y 18%.

3.7 Escalado de hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja

Luego de optimizadas las condiciones (pH, T, S y E) en el reactor de 500 mL, se trasladó el proceso a un reactor de 7.5 L de capacidad, tipo Bioflo® & Celligen 310, G628-011 (New Brunswick Scientific, USA), agitado a través de una turbina Rushton con un volumen de trabajo de 5L (Edinson, NJ, USA), con control de temperatura. Las condiciones a esta escala fueron las encontradas en el numeral 3.6.3 y 3.6.6, las cuales son: 58.5°C, pH 8.05, concentración de sustrato 45 g/L y concentración de enzima 4.42 g/L, el cual se mantiene constante con la adición de NaOH 2M usando una bomba peristáltica controlada automáticamente por un control de cascada con un sensor de pH. El reactor está equipado con calentamiento a través de un sistema de recirculación, cuenta con cuatro deflectores en la pared del tanque y un impulsor tipo turbina Rushton con diámetro de 0.077 m. Se usó el principio de similitud dinámica manteniendo constante el número de Reynolds (Re) entre el modelo (m) (500 mL) y el prototipo (p) (7.5 L), usando la ecuación 8 para hacer los cálculos de la velocidad de agitación (N) en el prototipo (p) (Gelves et al., 2013; Palmqvist et al., 2016).

Para este caso $N_M = 9.8 \text{ s}^{-1}$, $D_{i,m} = 5 \text{ cm}$, $D_{i,p} = 7.7 \text{ cm}$, por lo que despejando N_p de la ecuación 11 se obtiene una velocidad del impulsor en el prototipo de 250 rpm. Sin embargo, para evaluar el efecto de N sobre el proceso de hidrólisis se evaluó también 350 rpm.

3.8 Actividad antioxidante

Los mecanismos de acción de los antioxidantes se relacionan con la forma de reducción de los radicales libres, estos pueden ser SET (*single electron transfer*) o HAT (*hydrogen atom transfer*) (Santos-Sánchez et al., 2019). Los métodos basados en SET detectan la capacidad del antioxidante para transferir una especie química como metales, carbonilos y electrones, los métodos más usados de este tipo son ABTS (ácido 2,2' azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant. Power*). En el caso de los métodos HAT, se mide la capacidad de un antioxidante para inactivar un radical libre a través de la donación de un átomo de hidrógeno, uno de los métodos más usados asociado con este mecanismo es ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) (Santos-Sánchez et al., 2019). En el caso de la actividad quelante

de hierro AQH mide la capacidad del antioxidante por unirse con el hierro. A continuación, se describe la metodología de los métodos antioxidantes evaluados.

ABTS: Fue determinado de acuerdo con Zheng et al., (2016) con algunas modificaciones, la solución ABTS fue preparada mezclando 7mM ABTS y persulfato de potasio 2.45mM y se deja en oscuridad por 18 h. Luego 1 mL de la solución es adicionado a 100µL de muestra o buffer fosfato para el control y se deja en oscuridad por 1 h. La absorbancia fue medida a 730 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Scientific™, Massachusetts- EE.UU). Soluciones acuosas de Trolox entre 0 y 300 M se utilizaron para la calibración y los resultados son expresados como µmoLET/g prot o µmoLET/L

FRAP: Fue determinado de acuerdo con el método de Pulido et al., (2000) con algunas modificaciones, la solución FRAP fue preparada con 2.5 mL de TPTZ 10 mM, 2.5 mL de FeCl₃ 20 mM y 25 mL de buffer acetato 0.3 mM pH 3.6 en oscuridad a 37°C. Se adicionaron 30 µL de muestra o buffer acetato para el control, 90 µL de agua destilada y 900 µL de la solución, se dejó en oscuridad por 1.5 h. La absorbancia fue medida a 595 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Scientific™, Massachusetts- EE.UU). Soluciones acuosas de Trolox entre 0 y 500 M se utilizaron para la calibración y los resultados se expresan como µmoLET/g prot o µmoLET/L

ORAC: Fue determinado de acuerdo con Caliceti et al., (2017) con algunas modificaciones, en placas negras se adicionaron 50 µL de muestra, 75 µL de fosfato de sodio 0.075M pH 7 (blanco) o Trolox y 50 µl de la solución de fluoresceína (78 µM), se incubó por 15 min a 37°C, luego se adicionó 25 µL solución AAPH (2,2 '-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro) 221 mM. La fluorescencia (excitación: 485 nm, emisión: 535 nm) se registró cada minuto durante 2 h en un lector de microplacas multimodo Varioskan™ (Thermo Fisher, EE.UU). Los valores finales fueron calculados usando la relación lineal entre la concentración de Trolox y el área bajo la curva de fluorescencia versus tiempo. Soluciones acuosas de Trolox entre 0 y 75 µM se utilizaron para la calibración y los resultados se expresan como µmol ET/g prot.

Actividad quelante de hierro (AQH): El ensayo se realizó siguiendo la metodología de Choonpicharn & Jaturasitha, (2014) en la cual 1 mL de muestra o agua destilada (blanco) es mezclado con 20µL de ferrozina 5mM y 40µL de sulfato ferroso 20mM, se deja en oscuridad por 10 min. La absorbancia fue medida a 562nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Scientific™, EE.UU), la actividad quelante de hierro (AQH) es calculada como se muestra en la ecuación 11. Donde $A_{muestra}$ es la absorbancia de la muestra y A_{blanco} es la absorbancia del blanco.

$$AQH\% = \frac{A_{blanco} - A_{muestra}}{A_{blanco}} \times 100 \quad (11)$$

3.9 Separación y purificación de fracciones peptídicas con propiedades biológicas

3.9.1 Remoción de la sal de hidrolizado alcalino

El hidrolizado óptimo alcalino descrito en la sección 4.3.2 fue desalado por una columna de cartucho C18 Sep-Pak® Vac, 35cc (Waters Corporation, EE. UU), usando como eluyentes agua para remover la sal y acetonitrilo al 50% y 100% para recuperar las proteínas que quedaban adheridas a la fase estacionaria, de acuerdo con la metodología descrita por (J. Wang et al., 2018). Las fracciones donde quedó la proteína fueron sometidas a rota evaporación (a 45 ° C, 720 mm Hg de vacío), las muestras fueron transferidas a un liofilizador (FreeZone Bulk Tray Dryer, Labconco, EE. UU) y liofilizadas a -43°C por 48 h.

3.9.2 Fraccionamiento por ultrafiltración

Los hidrolizados enzimático y alcalino que mostraron mejor actividad antioxidante fueron fraccionados usando membranas de ultrafiltración. Este proceso consiste en centrifugar a 5000 x g durante 20 min a 10°C. Las membranas fueron lavadas por 6 veces entre cada muestra por medio de la centrifugación usando agua destilada. Posteriormente los sobrenadantes fueron sometidos a un proceso de ultrafiltración secuencial (Olagunju et al., 2018). usando membranas ultracel de celulosa regenerada, con corte de peso molecular de 100 kDa, 10 kDa y 3 kDa, por medio de unidades Amicon ultra-15 (Millipore, Massachusetts- EE.UU). Las fracciones fueron designadas así: >100, retenido de la membrana 100kDa, 100-10 el retenido de la membrana de

10 kDa obtenido del permeado de 100 kDa (10-100 kDa); 3-10, el retenido de la membrana de 3 kDa obtenido del permeado de 10 kDa (3–10 kDa); <3 el permeado de la membrana de 3 kDa (<3 kDa).

3.9.3 Purificación por HPLC

Las fracciones de los hidrolizados enzimáticos que tuvieron mejor actividad antioxidante fueron purificadas por RP-HPLC en una columna C-bridge X18 10 x 150 mm, 5 μ m (Waters Inc., EE. UU.) La fase móvil A fue (0.1% TFA en agua Milli-Q) y el tampón B (0.1% TFA en ACN), la velocidad de flujo se ajustó a 3.0 mL/min y la absorbancia se midió a 215 nm. El volumen de inyección fue de 500 μ L a una concentración de muestra de 10 g/L. La muestra se eluyó mediante un gradiente lineal de 0 a 65% de tampón B en 60 min (Jahandideh et al., 2018).

3.10 Secuenciación de péptidos con propiedades biológicas

Para identificar las secuencias de los péptidos antioxidantes, las fracciones obtenidas del RP-HPLC con mayor actividad antioxidante, fueron analizadas por medio de un analizador de tiempo de vuelo cuadrupolo (Q-TOF) operado en modo de iones positivos MS/MS. La identificación de las secuencias y la masa peptídica se realizó por cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). El análisis de datos se realizó utilizando el software MassLynx V4.1 (Micromass U.K. Ltd.) (Nimalaratne et al., 2015).

3.11 Evaluación de la actividad antioxidante mediante análisis basados en células

Las muestras que fueron evaluadas en cultivos celulares fueron los hidrolizados enzimático y alcalino óptimos con sus respectivas fracciones de diferentes pesos moleculares.

3.11.1 Cultivo y tratamiento de células A7r5 diferenciadas

La línea de células de músculo liso vascular de rata (*Rattus norvegicus*) (VSMC A7r5) fueron compradas de la colección ATCC (American Type Culture Collection) (CRL-1444, Manassas, VA, USA) y usadas entre los pases 3-8. Las células fueron mantenidas y crecidas en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de SFB (suero fetal

bovino) y 1% de solución antibiótica (penicilina, estreptomycin y gentamicina), e incubadas a 37°C y 5% de CO₂ hasta alcanzar la confluencia (Liang et al., 2017). Las células A7r5 fueron sembradas en platos de 48 pozos (Costar Corp.,USA), a una densidad de 1x10⁴ células/cm² y el medio de cultivo fue cambiado cada dos días. Después de 4 días post-siembra, el medio fue retirado y las células fueron pre-incubadas por 24 horas con la muestra o con DMEM, según corresponda.

3.11.2 Efecto citotóxico sobre las células A7r5

El efecto citotóxico sobre las células A7r5 fue determinado por el método Alamar Blue, el cual es una solución a base de resazurina, un compuesto no tóxico, permeable a las células, de color azul y prácticamente no fluorescente. Al entrar en las células vivas, la resazurina se reduce a resorufina, un compuesto de color rojo y altamente fluorescente. Los cambios en la viabilidad se pueden detectar fácilmente utilizando un lector de placas basado en absorbancia o fluorescencia.

Las células A7r5 fueron sembradas en platos de 96 pozos a 1x10⁴ células/cm². Después de alcanzar el 80% de confluencia, las células fueron tratadas con 200 µL de las muestras de los hidrolizados alcalinos y enzimáticos a 2mg/mL (disueltos en medio de cultivo) durante 24 h, la concentración fue definida de acuerdo con estudios previos realizados por la Universidad de Alberta (Chakrabarti et al., 2017; Wang et al., 2018). Luego, el medio de cultivo fue reemplazado con 200 µL de solución de Alamar Blue al 10% (disuelta en medio de cultivo) durante 4 h de incubación (protegida de luz), después de lo cual se transfirieron 150 µL a una placa opaca de 96 pocillos para la detección de la señal de fluorescencia en un lector de microplacas (SpectraMax M3, Molecular devices,CA, U.S.A), las longitudes de onda de emisión y excitación fueron de 590 nm y 560 nm, respectivamente. El control era el medio de crecimiento sin ningún tratamiento (Liang et al., 2017). El porcentaje de viabilidad celular fue calculado siguiendo la ecuación (12).

$$\text{Porcentaje de viabilidad (\%)} = \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}}} \quad (12)$$

Donde A_{muestra} es la absorbancia de la muestra, A_{blanco} es la absorbancia del blanco (medio de cultivo) y A_{control} es la absorbancia del control que corresponde a las células sin la incubación de la muestra.

3.11.3 Efecto citoprotector sobre las células A7r5

Inducción del estrés oxidativo: El estrés oxidativo fue inducido de acuerdo con el método de Wang et al., (2018). Después de la pre-incubación de 1 h con las muestras o con DMEM (control de estrés), las células fueron tratadas por 1 h con una solución angiotensina II a 1 μM (37 °C/5% CO_2 /95% humedad relativa).

Detección de ROS: El nivel de ROS fue monitoreado midiendo los cambios en la fluorescencia que resulta de la oxidación de DHE por superóxido para formar 2-hidroxi-etidio (2-OH-E+) (ex 500-530 nm/em 590-620 nm) o por oxidación inespecífica por otras fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS) para formar etidio (E+) (ex 480 nm/em 576 nm), siguiendo el método descrito por Wang et al., (2018).

Después de 1 h de incubación con la angiotensina II, el medio de cultivo fue removido, 400 μL de DHE 20 μM fue adicionado a cada pozo y las células fueron incubadas por 30 min a 37 °C protegidas de la luz. Luego las células fueron lavadas con buffer fosfato salino por tres veces. La fluorescencia fue detectada por medio de un microscopio de fluorescencia (Olympus IX81, Olympus Canadá Inc., ON, Canadá). Las imágenes se tomaron al azar a lo largo del campo, se adquirieron tres fotos por pozo. La media de intensidad de la fluorescencia (% MFI) se determinó con el software imagej y se presentó como un porcentaje con respecto al control no tratado. Al menos 1×10^4 células fueron analizadas para cada muestra. El control positivo fue solo el medio con la angiotensina II, y el control negativo era el medio sin angiotensina II.

3.12 Análisis estadístico

Los diseños experimentales fueron construidos y analizados empleando el software Design- Expert® 8.0.5 (Stat-Ease, EE.UU). Los análisis de los modelos obtenidos fueron probados mediante análisis de varianza (ANOVA). La validez de los resultados obtenidos en el

modelo estadístico se evaluó de acuerdo con los supuestos de homogeneidad de varianzas, independencia de los errores y normalidad (Montgomery, 2017).

Los resultados de comparación de medias en los análisis de la actividad antioxidante fueron evaluados estadísticamente empleando el software Stagraphics® Centurion XV (Virginia, EE. UU.). Los valores se expresaron como la media \pm desviación estándar de al menos dos réplicas. Las diferencias entre las medias se identificaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y una prueba de comparación de medias usando la prueba de Duncan con un nivel de significación de 0.05 (95% de confianza) (Montgomery, 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de escamas y esqueletos

En la tabla 1 se muestran la composición proximal de las escamas y esqueletos de tilapia roja los cuales no han sido reportados previamente. Sin embargo, otros autores han señalado resultados de composición de escamas y esqueletos de otras especies. Así como Huang et al., (2016) reportaron valores de proteína menores (49.42%) en tilapia (*Oreochromis sp*) y Matmaroh et al., (2011) encontraron que la proteína de escamas de salmonete amarillo (*Parupeneus cyclostomus*) era 45.2%. Para el caso de los esqueletos algunos autores reportan valores mayores de proteína y grasa, como por ejemplo, Chuesiang & Sanguandeeikul, (2015), encontraron que la proteína era de 50.6% y la grasa 30.6% en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) y Gajanan et al., (2016) encontraron que en esqueletos de pez rosado (*Nemipterus japonicus*) la proteína era 68.45% y la grasa 15.14 %.

Tabla 1. Composición proximal de escamas y esqueletos

Composición g/100g	Escamas enteras	Esqueletos molidos
Humedad	20.3 ± 0.1	7.19 ± 0.1
Proteína	63.7 ± 0.1	25.0 ± 0.0
Lípidos	0.9 ± 0.0	16.9 ± 0.2
Cenizas	15.1 ± 0.0	50.9 ± 0.0

Los valores reportados son el promedio de determinaciones hechas por triplicado con diferentes lotes de los subproductos.

En la tabla 2 se presenta la composición aminoacídica de las escamas y esqueletos de tilapia roja, donde se puede observar que el porcentaje de aminoácidos esenciales es mayor en las escamas que en los esqueletos, lo cual puede estar indicando que el valor biológico de su proteína es mayor (Smith, 2017). Para ambos subproductos, la glicina es el aminoácido en mayor proporción seguido por prolina, ácido glutámico e hidroxiprolina, los cuales han sido reportados como abundantes en escamas de tilapia nilótica (*Oreochromis nilocitus*) (El-Rashidy et al., 2015)

tilapia (*Oreochromis spp.*)(Huang et al., 2016), tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) (Chen et al., 2016), pez dorado (Ali et al., 2017), así mismo para los esqueletos de dorada (*Sparus aurata*)(Pateiro et al., 2020), pez gato (*Siluriformes sp.*) (Bechtel et al., 2019), bacalao (*Gadus morhua*) (Tan et al., 2018).

Tabla 2. Concentración relativa de aminoácidos en escamas y esqueletos

Aminoácidos	residuos/1000 residuos	
	Escamas	Esqueletos
Aminoácidos esenciales		
Histidina	26.2	8.5
Treonina	15.5	4.1
Arginina	0.9	2.0
Valina	9.7	3.7
Metionina	6.9	5.2
Fenilalanina	4.2	2.0
Isoleucina	15.6	10.9
Leucina	5.0	4.8
Lisina	12.0	6.0
Aminoácidos no esenciales		
Ácido aspártico	55.5	19.4
Ácido glutámico	105.9	31.3
Asparagina	2.7	5.3
Serina	46.1	17.3
Glicina	346.9	465.3
Citrulina	9.9	29.2
Alanina	11.1	13.3
Tirosina	47.8	30.4
Cisteina	14.0	9.7
Prolina	163.5	232.6
Hidroxiprolina	100.7	99.0
Porcentaje de aminoácidos esenciales	9.6	4.7
Porcentaje de aminoácidos no esenciales	90.4	95.3

La composición de aminoácidos está relacionada con los tipos de proteínas como colágeno tipo I, queratina y mucina presente en los subproductos de estudio (Wangtueai & Noomhorm, 2009), es decir, alto contenido de prolina y glicina es aportado por el colágeno (Gauza-Włodarczyk et al., 2017), en el caso de la queratina los aminoácidos predominantes son las glicina y el ácido glutámico (Wang et al., 2016) y finalmente la mucina es una glicoproteína rica en serina, treonina y prolina (Bansil & Turner, 2006).

4.2 Selección del sustrato de trabajo

Los resultados de la concentración de proteína de los hidrolizados alcalinos de escamas y esqueletos mostraron que fue mayor en el caso de las escamas (Figura 8), a pesar de que gran parte de la grasa de los esqueletos fue removida con los lavados, es posible que la grasa residual fuera un interferente para la extracción de proteína, dado que al ser insoluble en solución acuosa genera un producto no homogéneo que interfiere en la reacción de hidrólisis (Abdollahi & Undeland, 2019, Zhong et al., 2016)

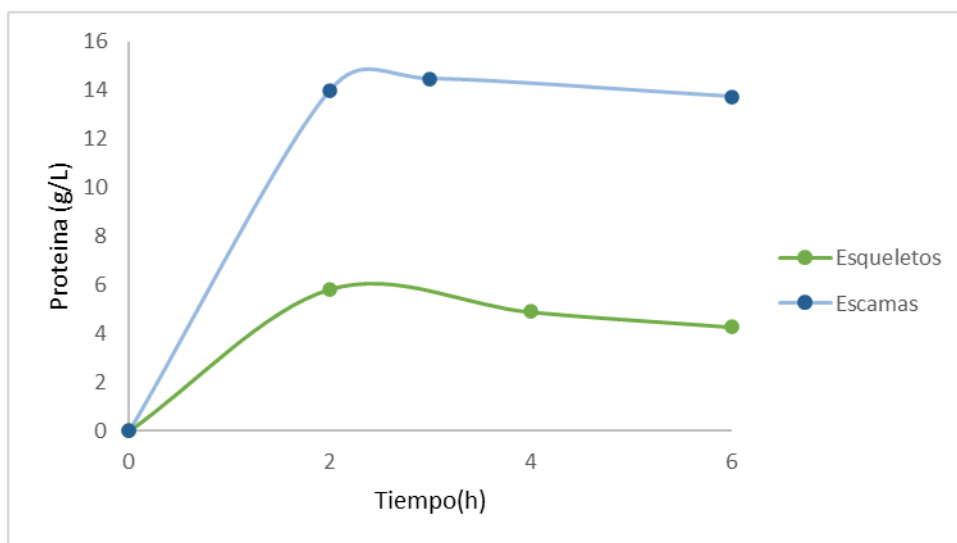


Figura 8. Concentración de proteína soluble durante la hidrólisis alcalina de escamas y esqueletos.

Las hidrólisis alcalinas se llevaron a cabo usando NaOH 2M, la concentración de sustrato fue 4.8% p/p, la temperatura fue 60°C y la agitación 500 rpm. La proteína soluble fue medida por el método de Biuret.

Para el caso de la hidrólisis enzimática los resultados obtenidos (Figura 9) se observa que el GH es mayor en la hidrólisis de escamas.

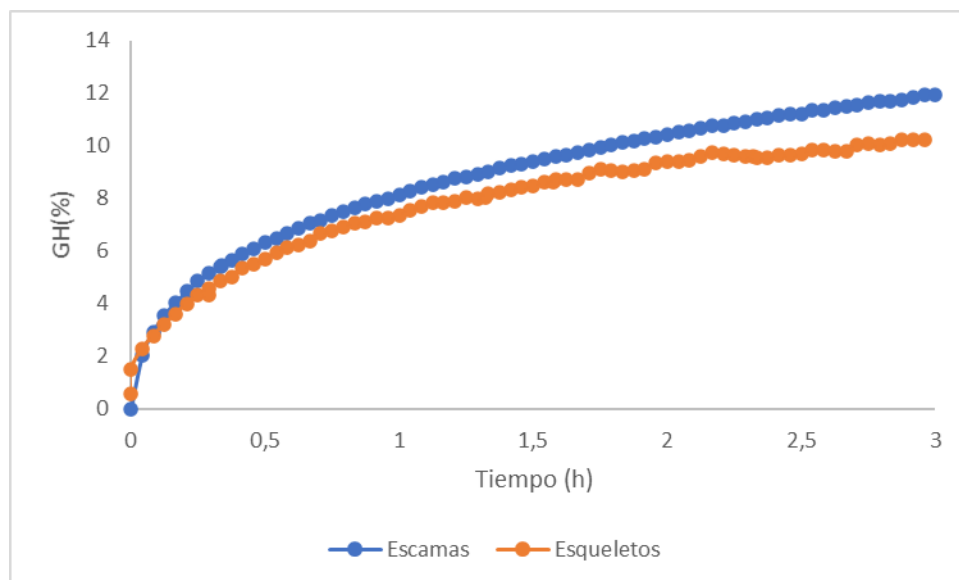


Figura 9. Variación del GH en el tiempo para la hidrólisis enzimática de escamas y esqueletos. La hidrólisis enzimática fue llevada a cabo con concentración de sustrato 8 g/L, la concentración de la enzima 0.4 g/L, el pH fue 8, la temperatura 55°C y la agitación 560 rpm. El GH se midió usando el método del pH-stat

De acuerdo con los resultados anteriores se decide continuar el trabajo de investigación con escamas, dado que el esqueleto es un sustrato que presenta mayores interferencias para la extracción de proteína y por lo tanto para la obtención de péptidos bioactivos.

4.3 Hidrólisis alcalina de escamas

4.3.1 Efectos de temperatura, concentración de NaOH y porcentaje de escamas sobre la hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja

La Tabla 3 muestra las corridas experimentales del diseño central compuesto en forma aleatoria, con los resultados de las variables de respuesta P, ABTS, FRAP y AQH en cada una. Mientras tanto, los resultados del ANOVA del diseño central compuesto se muestran en la Tabla 4, que indica la importancia estadística de cada factor en cada variable de respuesta (Valor - P).

Tabla 3. Diseño experimental de superficie de respuesta central compuesto para evaluación del efecto de T, N, S sobre la hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja.

Corrida	T (°C)	N (M)	S (%)	P (g/L)	ABTS ($\mu\text{M ET/L}$)	FRAP ($\mu\text{M ET/L}$)	AQH (%)
1	60.0	0.5	2.5	0.6	25.3	0.0	55.3
2	50.0	1.3	9.2	22.7	1395.1	343.9	40.4
3	50.0	1.3	5.0	14.6	489.2	129.0	54.7
4	50.0	1.3	0.8	14.9	976.2	257.9	56.6
5	33.2	1.3	5.0	17.4	822.6	212.7	54.3
6	50.0	0.0	5.0	21.3	1195.1	263.1	56.6
7	50.0	1.3	5.0	0.7	63.0	0.0	21.2
8	50.0	1.3	5.0	9.0	526.4	79.7	33.4
9	40.0	2.0	2.5	1.0	140.5	8.2	42.8
10	66.8	1.3	5.0	4.1	117.6	0.0	30.8
11	60.0	0.5	7.5	15.7	1238.6	304.6	47.0
12	50.0	1.3	5.0	16.6	883.5	238.7	55.1
13	40.0	0.5	7.5	23.4	1590.7	412.0	47.0
14	60.0	2.0	2.5	8.6	698.8	51.9	41.4
15	60.0	2.0	7.5	17.4	1266.1	349.8	49.6
16	50.0	2.5	5.0	16	1084.9	277.2	61.4
17	50.0	1.3	5.0	9.5	154.6	38.2	28.7
18	40.0	2.0	7.5	15.1	1111	274.2	47.2
19	40.0	0.5	2.5	7.7	616.8	72.7	52.1

T: Temperatura(°C)

N: Concentración de NaOH (M)

S: Porcentaje de escamas en solución (%)

P: Concentración de proteína soluble (g/L)

ABTS: Actividad antioxidante por el método ABTS ($\mu\text{M ET/L}$)

FRAP: Actividad antioxidante por el método FRAP ($\mu\text{M ET/L}$)

AQH: Actividad quelante de hierro (%)

Los factores sin efectos significativos ($P > 0.05$) se eliminaron del ANOVA, y se determinó el R^2 y la falta de ajuste del modelo resultante. Ambos datos se presentan en la Tabla 4 para los modelos ajustados de P, ABTS, FRAP y AQH, que aparecen en las ecuaciones 12, 13, 14 y 15, respectivamente.

Tabla 4. Valores P de las variables respuesta en el diseño central compuesto de la hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja

Variable	P	ABTS	FRAP	AQH
Modelo	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0007
T	0.0475	0.0001	0.0005	0.016
N	< 0.0001	0.0002	0.0043	0.0008
S	< 0.0001	< 0.0001	0.0001	
T*N		0.0145		0.0004
T*S		0.0424		
N*S	0.0109			
N ²	0.0002			
S ²	0.0016			
Falta de ajuste	0.2245	0.7619	0.3329	0.0989
R ²	0.9635	0.8855	0.7921	0.7533
R ² ajustado	0.9416	0.8411	0.7505	0.6774

T: Temperatura(°C)

N: Concentración de NaOH (M)

S: Porcentaje de escamas en solución (%)

P: Concentración de proteína soluble (g/L)

ABTS: Actividad antioxidante por medio del método ABTS ($\mu\text{M ET/L}$)

FRAP: Actividad antioxidante por medio del método FRAP ($\mu\text{M ET/L}$)

AQH: Actividad quelante de hierro (%)

Los coeficientes α_i en estas ecuaciones corresponden a los efectos de los factores en relación con sus valores reales. Los valores de R^2 y la falta de ajuste no significativa ($P > 0.05$) en la Tabla 4 sugieren que estos polinomios representan la relación entre las respuestas y los factores

$$P = 15.7 + 1.2T + 4.4N + 4.3S + 1.9(N * S) - 2.6N^2 - 1.9S^2 \quad (13)$$

$$ABTS = 757.5 + 286.3T + 280.1N + 297.1S + 196.4(N * T) + 156.8(T * S) \quad (14)$$

$$FRAP = 174.4 + 82.7T + 63.3N + 96.6S \quad (15)$$

$$AQH = 47.8 + 5.1 T - 0.8 N + 8.0 E - 11.6 (N * T) \quad (16)$$

El ANOVA muestra que las variables temperatura (T) y concentración de hidróxido de sodio (N) son significativas en los cuatro modelos evaluados; sin embargo, la concentración de sustrato es significativa para P, ABTS y FRAP pero no para AQH. En particular, la temperatura tiene un impacto significativo en todas las respuestas, principalmente en términos lineales, pero en el caso de AQH hay una interacción entre N y T, lo cual muestra el efecto combinado sobre la variable respuesta, es decir, el efecto de la concentración de NaOH depende de la temperatura. El impacto positivo de T podría deberse a que las proteínas se disuelven e hidrolizan entre 40 y 100°C (Chen et al., 2017).

Por otro lado, N tiene un efecto significativo en todas las respuestas, como puede observarse P, ABTS y FRAP aumentan con N, mientras que AQH disminuye. En el caso en que las variables aumentan se puede atribuir al despliegue parcial de la proteína por efecto del pH alcalino (Chen et al., 2017; Nolsøe & Undeland, 2009), lo que puede favorecer la exposición de puntos de corte y de grupos con capacidad para donar electrones. Sin embargo, los pHs alcalinos también pueden deteriorar algunos péptidos por mecanismos como el ataque nucleofílico rápido en los grupos carbonilo, que puede ser acelerado por el calor (Da Silva et al., 2015, Essuman et al., 2014), lo que podría explicar la pérdida de actividad AQH. Finalmente, la concentración de sustrato tiene un efecto significativo en las cuatro respuestas, debido a que al tener mayor contenido de proteína mayor será la probabilidad que se presenten cortes en la misma con lo cual se liberarían mayor cantidad de péptidos.

Las ecuaciones polinomiales 13-16 se graficaron en la superficie de respuesta (figuras 10-13), con el objetivo de analizar el comportamiento gráfico de cada respuesta. Para cada gráfico, la variable independiente no representada en el gráfico se posicionó en su nivel más alto.

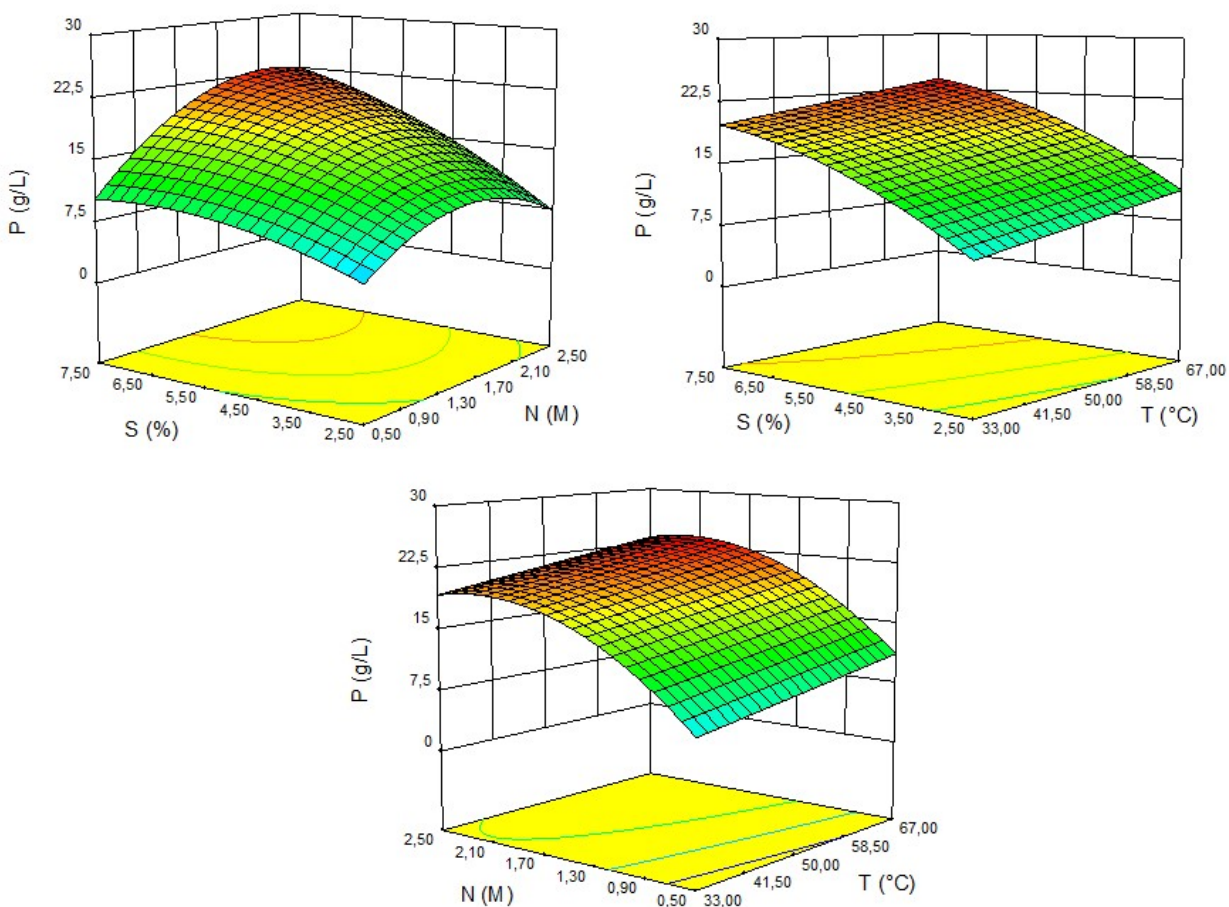


Figura 10. Gráficos 3D de superficie de respuesta para los efectos de interacción de variables independientes de N (M), T (°C) y S (%) sobre la variable dependiente P (g/L)

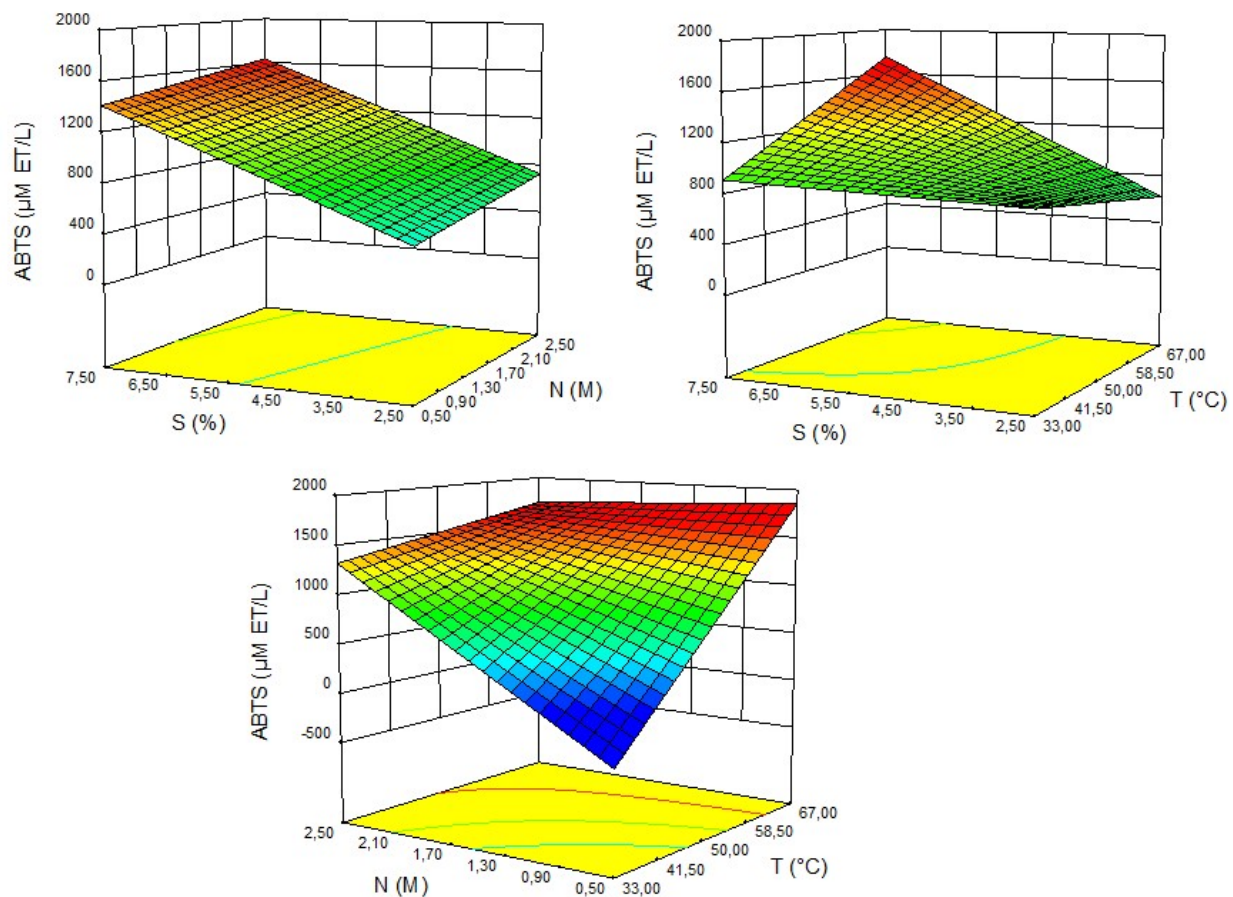


Figura 11. Gráficos 3D de superficie de respuesta para los efectos de interacción de variables independientes de N (M), T ($^{\circ}\text{C}$) y S (%) sobre la variable dependiente ABTS ($\mu\text{M ET/L}$)

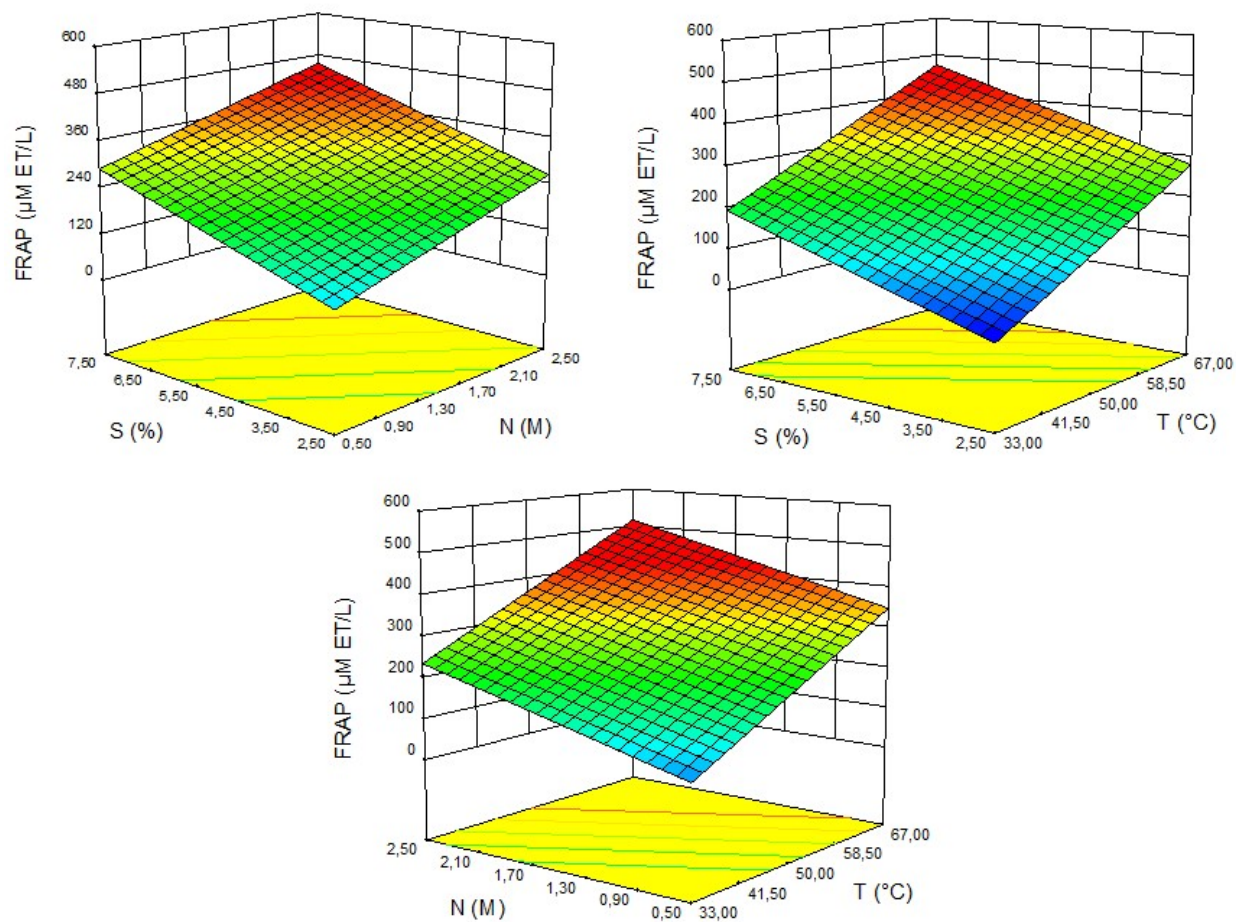


Figura 12. Gráficos 3D de superficie de respuesta para los efectos de interacción de variables independientes de N (M), T ($^{\circ}\text{C}$) y S (%) sobre la variable dependiente FRAP ($\mu\text{M ET/L}$)

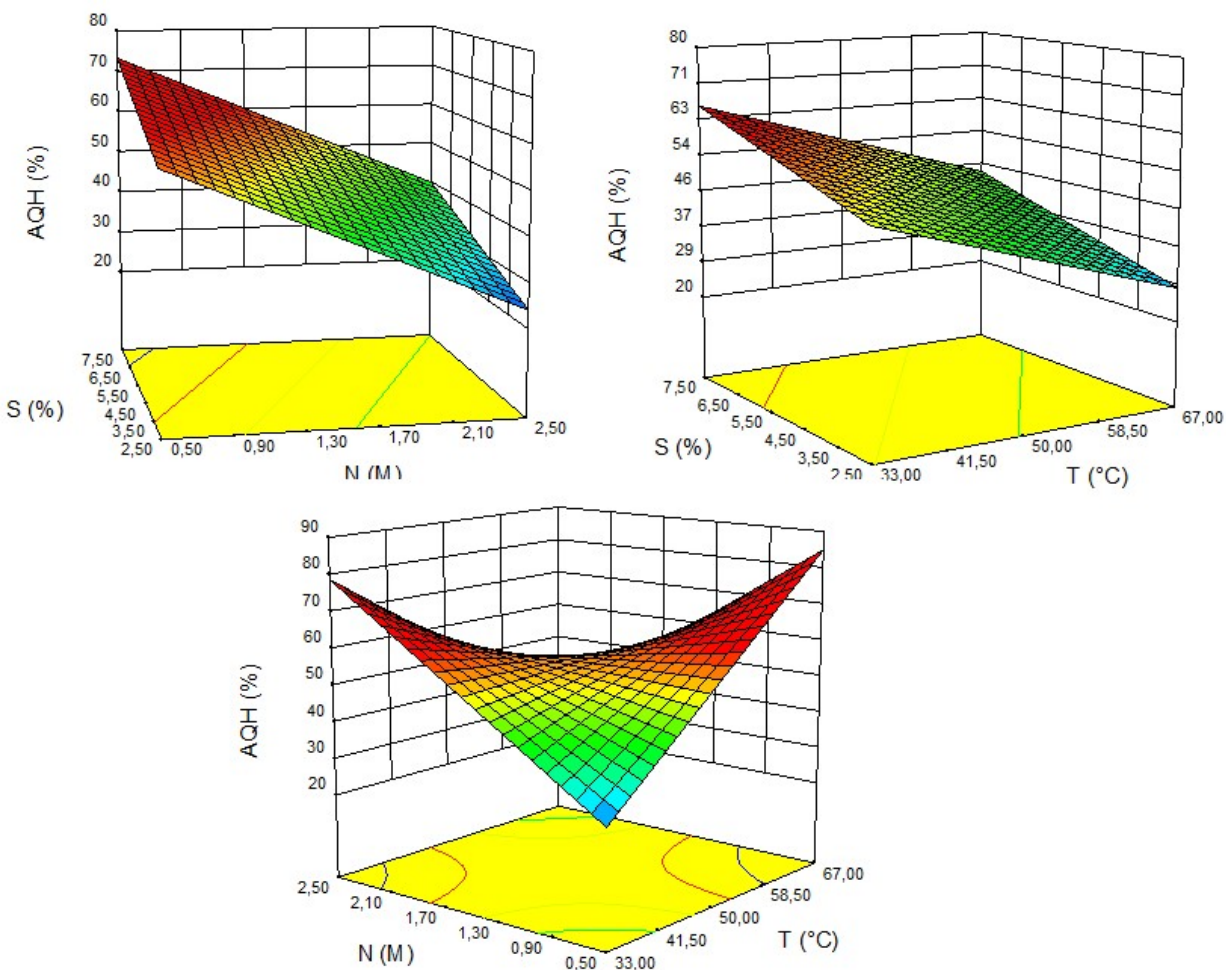


Figura 13. Gráficos 3D de superficie de respuesta para los efectos de interacción de variables independientes de N (M), T (°C) y S (%) sobre la variable dependiente AQH (%)

Los criterios de optimización se definieron para obtener un hidrolizado con mayores contenidos de proteína y actividad antioxidante. Las condiciones óptimas de la hidrólisis alcalina son 60 °C, NaOH 2M y 7.5% de escamas. Estos resultados coinciden con los de Nolsøe & Undeland (2009) y Surasani et al., (2017) quienes informaron que la solubilización de la proteína comienza a pH 10 y mayor temperatura.

La tabla 5 presenta los resultados de la verificación experimental las condiciones óptimas de la hidrólisis alcalina. Los valores predichos son cercanos a los experimentales, en el caso de la P y FRAP son más altos, pero ABTS y AQH son más bajos.

Tabla 5. Verificación experimental de las condiciones definidas en la optimización de la hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja

Variable	Predicho	Experimental
P	22.9	20.8±1.0
ABTS	1581.4	1966.6±190.7
FRAP	416.9	324.1±8.9
AQH	48.4	60±1.0

P: Concentración de proteína soluble (g/L)

ABTS: Actividad antioxidante por medio del método ABTS ($\mu\text{M ET/L}$)

FRAP: Actividad antioxidante por medio del método FRAP ($\mu\text{M ET/L}$)

AQH: Actividad quelante de hierro (%)

Los valores son expresados como la media \pm DS

Los resultados de la actividad antioxidante por ABTS (288 $\mu\text{mol Trolox/g}$) son mayores a los reportados por Chuaychan & Benjakul, (2016) quienes obtuvieron 80 $\mu\text{mol Trolox/g}$ y Mosquera et al., (2014) que obtuvieron 107 $\mu\text{mol Trolox/g}$, en el caso de FRAP (15.87 $\mu\text{mol Trolox/g}$) los resultados son mayores a los reportados por Wangtueai et al., (2016) quienes obtuvieron 9 $\mu\text{mol Trolox/g}$ y (Chuaychan et al., (2017) que obtuvieron 3 $\mu\text{mol Trolox/g}$, para AQH (60%) los resultados son menores a los reportados por Choonpicharn & Jaturasitha, (2014) quienes obtuvieron 70% y Sabeena Farvin et al., (2014) quienes obtuvieron 70%.

4.3.2 Efecto del tiempo sobre la hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja

La Tabla 6 presenta el comportamiento en función del tiempo para las variables respuesta P, ABTS, FRAP y AQH. Para el caso de P, ABTS y AQH se muestra que 2 h son suficientes para extraer una gran cantidad de proteína con actividad antioxidante y quelante de hierro ya que no hay diferencias estadísticamente significativas (valor $p < 0.05$) entre los tiempos evaluados, esto significa que al aumentar el tiempo de la hidrólisis no se consiguen mejores resultados, sin embargo, para FRAP hay una diferencia a las 4 h. Este comportamiento del proceso podría ser porque durante la hidrólisis alcalina ocurre una generación de polipéptidos rápidamente y luego ocurre la degradación a baja velocidad (Ingadottir & Kristinsson, 2010). Estos resultados son superiores a los reportados por otros autores en los cuales se requieren más de 4 h para obtener hidrolizados con menor actividad antioxidante (Mosquera *et al.*, 2014; Chuaychan and Benjakul, 2016).

Tabla 6. Evaluación de variables P, ABTS, FRAP y AQH en función del tiempo en la hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja.

Tiempo (h)	P (g/L)	ABTS($\mu\text{M ET/L}$)	FRAP ($\mu\text{M ET/L}$)	AQH (%)
2	22.9 \pm 0.2 ^a	1722.6 \pm 197.2 ^a	178.9 \pm 10.3 ^a	61 \pm 8.1 ^a
4	22.8 \pm 0.8 ^a	1862.1 \pm 383.8 ^a	200.2 \pm 37.6 ^{ab}	53 \pm 10.1 ^a
8	23.6 \pm 0.8 ^a	1824.1 \pm 63.3 ^a	228.8 \pm 7.1 ^b	58 \pm 1.5 ^a

P: Concentración de proteína soluble (g/L)

ABTS: Actividad antioxidante por medio del método ABTS ($\mu\text{M ET/L}$)

FRAP: Actividad antioxidante por medio del método FRAP ($\mu\text{M ET/L}$)

AQH: Actividad quelante de hierro (%)

Los datos son expresados como media \pm DS de tres experimentos independientes. Las letras indican diferencias estadísticas significativas (valor $p < 0.05$) entre los tiempos.

En la tabla 7 se muestra la concentración relativa de aminoácidos en el hidrolizado alcalino, al comparar esta con los resultados de las escamas (Tabla 2), se puede concluir que la hidrólisis alcalina favoreció la formación de péptidos constituidos por mayor presencia de aminoácidos esenciales ya que este porcentaje pasó del 9.6% al 15%. Algunos aminoácidos se vieron afectados por el tratamiento alcalino como es el caso de arginina, valina, metionina, fenilalanina, ácido glutámico, asparagina, citrulina, alanina y cisteína. Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Wang et al., (2017), respecto a que la hidrólisis alcalina genera muy buenos rendimientos, pero con pobre funcionalidad y valor biológico.

Tabla 7. Concentración relativa de aminoácidos en el hidrolizado alcalino

Aminoácidos	residuos/1000 residuos
Aminoácidos esenciales	
Histidina	20.2
Treonina	4.6
Arginina	1.4
Valina	19.0
Metionina	26.3
Fenilalanina	10.0
Isoleucina	36.5
Leucina	5.2
Lisina	10.2
Aminoácidos no esenciales	
Ácido aspártico	8.2

Ácido glutámico	10.3
Asparagina	3.9
Serina	10.4
Glicina	470.6
Citrulina	55.4
Alanina	12.0
Tirosina	41.2
Cisteina	52.0
Prolina	46.8
Hidroxiprolina	34.8
Porcentaje de aminoácidos esenciales	15.0
Porcentaje de aminoácidos no esenciales	85.0

4.4 Hidrólisis enzimática de escamas

4.4.1 Determinación del h_{TOT} en escamas

De acuerdo con el aminograma reportado en la tabla 2 y las ecuaciones 9 y 10, se determinó que el h_{TOT} era 8.85 usando como referencia el aminoácido lisina, otros autores han reportado valores como 8.6 para peces en general (Adler-Nissen, 1986) y 9.3 reportado para subproductos de Atlantic Salmon (*Salmo salar*) (Aspevik et al., 2016).

4.4.2 Efecto del pH y T sobre la hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja

En la tabla 8 se presentan las corridas experimentales en forma aleatoria, con los valores de las respuestas para cada una de las enzimas, correspondientes al diseño experimental factorial central compuesto.

Tabla 8. Diseño experimental de superficie de respuesta central compuesto para evaluación del efecto de pH y T sobre la hidrólisis de escamas de tilapia roja con Alcalase® 2.4 L y Flavourzyme® 500 L

Alcalase® 2.4 L				Flavourzyme® 500 L			
T (°C)	pH	GH (%)	P (g/L)	T (°C)	pH	GH (%)	P (g/L)
65.00	10.0	6.2	6.0	55.0	8.5	6.9	4.3

69.14	9.0	8.2	2.2	55.0	7.8	6.6	5.1
55.00	7.6	17.6	6.8	55.0	7.8	6.9	5.2
55.00	9.0	15.1	5.4	65.0	8.3	4.6	5.0
45.00	8.0	12.0	4.5	55.0	7.8	5.2	5.5
55.00	9.0	16.6	2.8	69.1	7.8	3.7	5.1
55.00	9.0	15.8	5.9	45.0	8.3	7.2	4.5
55.00	9.0	16.4	6.4	55.0	7.8	4.5	5.5
65.00	8.0	14.9	5.9	55.0	7.8	5.5	7.0
55.00	9.0	16.2	5.7	65.0	7.3	1.1	5.3
45.00	10.0	7.5	5.8	45.0	7.3	3.9	4.6
55.00	10.4	8.6	2.6	40.9	7.8	6.6	4.2
40.86	9.00	8.0	2.8	55.0	7.1	3.3	5.8

P: Concentración de proteína soluble (g/L)

GH: Grado de hidrólisis (%)

T: Temperatura (°C)

Con los resultados de la tabla 8, se desarrolló el análisis de varianza (ANOVA) para establecer el efecto de los factores sobre las respuestas, el cual se presenta en la tabla 9. En la que se observa que los modelos representan adecuadamente los datos experimentales, teniendo valores de R^2 aceptables y carencias de ajuste no significativas, en todos los casos. Los dos factores ejercen efectos significativos sobre ambas respuestas en las dos enzimas. Para GH existe efecto significativo del pH tanto en el término lineal como cuadrático en Alcalase® 2.4 L, además de interacciones de T y pH, mientras que en Flavourzyme® 500 L solo tienen efecto los términos lineales. Por su parte la proteína extraída, se ve afectada de forma lineal por ambas variables en Alcalase® 2.4 L, mientras que en Flavourzyme® 500 L solo la temperatura tiene efecto, pero en forma lineal y cuadrática.

Tabla 9. Valores P de los modelos de pH y temperatura para Alcalase® 2.4 L y Flavourzyme® 500 L

Factor	Alcalase® 2.4 L		Flavourzyme® 500 L	
	GH (%)	P (g/L)	GH (%)	P (g/L)
Modelo	< 0.0001	0.0002	< 0.0001	0.0017
pH	< 0.0001	0.0009	0.0002	
T	0.2689	0.0002	< 0.0001	0.0075

pH*T	0.006			
pH ²	0.0001			
T ²	< 0.0001	0.0349		0.0029
Carencia de ajuste	0.5752	0.0824	0.3793	0.5153
R ²	0.9904	0.877	0.8955	0.7578
R ² ajustado	0.9836	0.836	0.8746	0.7039

P: Concentración de proteína soluble (g/L)

GH: Grado de hidrólisis (%)

T: Temperatura (°C)

A partir del ANOVA (tabla 9) se obtuvieron modelos polinomiales de segundo orden para cada respuesta en cada enzima, cuyos coeficientes son calculados por regresión múltiple. Los modelos son el resultado de la exclusión de términos no significativos ($p > 0,05$), conservando la jerarquía del modelo.

Para el caso de Alcalase® 2.4 L, las ecuaciones 17 y 18, describen el comportamiento de GH y P, respectivamente. Las diferencias de signos entre el término lineal y cuadrático en una misma ecuación indican que existe un punto extremo para esa respuesta en el rango de trabajo en función de la variable en cuestión. En el caso de GH se tiene un punto máximo en función de pH y de T, como puede apreciarse en el comportamiento gráfico de este polinomio (figura 14a). Para el caso de P (figura 14b), existe un punto máximo solo en función de T.

$$GH = -259.8 + 31.0 pH + 5.4 T - 0.1 pH * T - 1.6 pH^2 - 0.04 T^2 \quad (17)$$

$$P = -9.9 - 1.1 pH + 0.8 T - 5.97 \times 10^{-3} T^2 \quad (18)$$

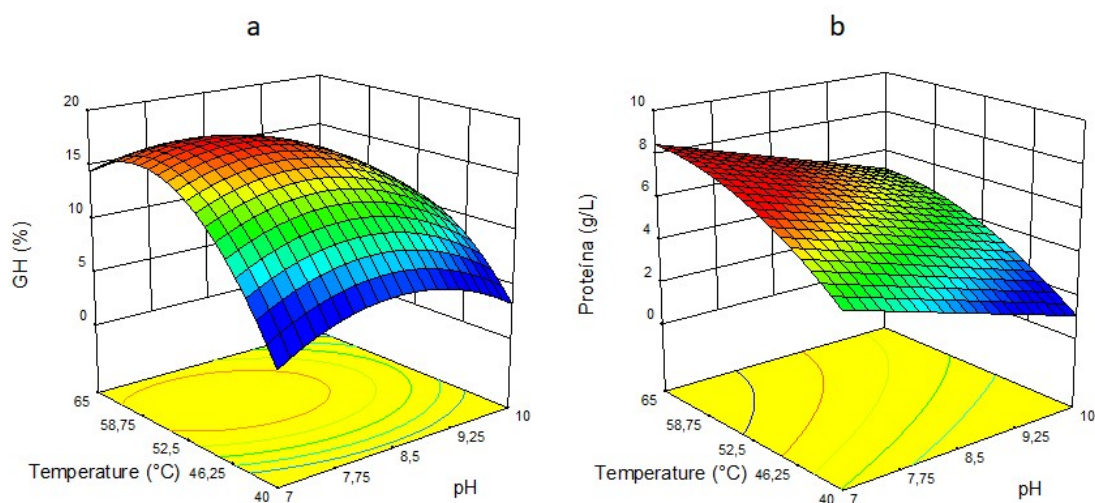


Figura 14. Gráficos 3D de superficie de respuesta para los efectos de interacción de variables independientes de pH y temperatura (°C) usando Alcalase® 2.4 L sobre las variables dependientes GH (a) y proteína (b)

En el caso de la Flavourzyme® 500 L las ecuaciones 19 y 20 describen el comportamiento de GH y P, respectivamente. El comportamiento gráfico de estas ecuaciones se presenta en las figuras 15a y 15b, respectivamente. Estos modelos indican que GH depende de ambos factores en forma lineal, mientras que P depende solo de T en forma cuadrática. El GH se incrementa con pH y se disminuye con T en el rango de trabajo, mientras que P es independiente de pH y tiene un punto máximo en función de T.

$$GH = -11.6 - 0.1 T + 2.9 pH \quad (19)$$

$$P = -8.6 + 0.5 T - 4.041 \times 10^{-3} T^2 \quad (20)$$

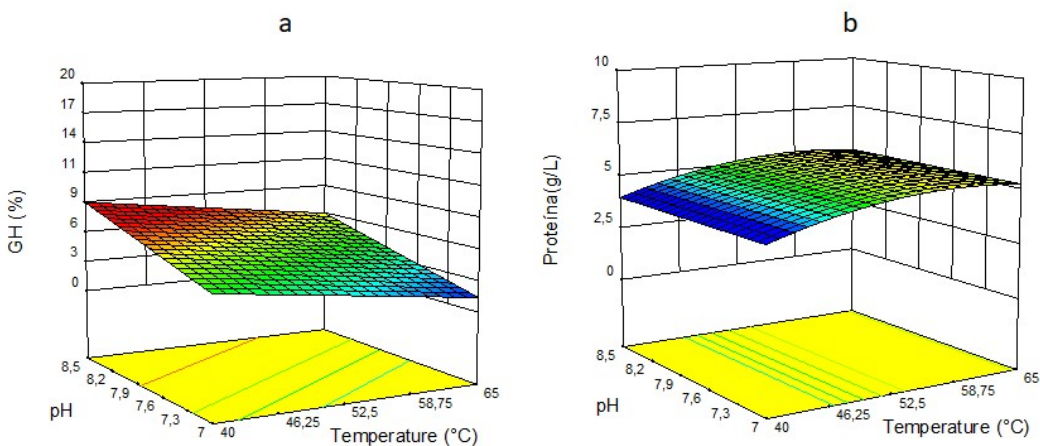


Figura 15. Gráficos 3D de superficie de respuesta para los efectos de interacción de variables independientes de pH y temperatura (°C) usando Flavourzyme® 500 L sobre las variables dependientes GH (a) y proteína (b)

El pH favorece el GH para Flavourzyme® 500 L y lo desfavorece para Alcalase® 2.4 L, mientras que la extracción de proteína se ve desfavorecida para Alcalase® 2.4 L por esta variable. Un posible motivo de disminución de los grados de hidrólisis con aumentos de pH se ha atribuido a aumentos en la desnaturalización de la enzima y, por tanto, disminución de su actividad biológica (Teshnizi et al., 2020, Anal et al., 2013)

En general, los efectos del pH se deben a que cambios en su nivel afectan tanto al sustrato como a la enzima, porque cambian la distribución de cargas y la conformación de las proteínas (Roslan et al., 2014). Además, el pH puede influenciar la disociación de grupos activos de la enzima, afectando la dinámica de asociación de ésta con el sustrato (Morales et al., 2017; Shi et al., 2005).

El efecto de la temperatura en ambas enzimas se puede explicar si se tiene en cuenta que incrementos de temperatura aumentan la energía cinética de las moléculas en general, pero debido a la naturaleza proteica de las enzimas su estructura terciaria se ve comprometida cuando se alcanzan ciertos valores de temperatura, lo cual disminuye las posibilidades de unión entre la enzima y el sustrato por desnaturalización térmica de la enzima (Noman et al., 2018), que a su vez conduce a la pérdida de actividad catalítica, cuando se trabaja por encima de un cierto límite de temperatura (Pérez-Gálvez et al., 2011; Prieto et al., 2008).

Los modelos de las ecuaciones (17-20) se optimizaron con el objetivo de maximizar GH y P. Los resultados entregaron como condiciones óptimas de pH y T para Alcalase® 2.4 L son 8.1 y 58.5°C, mientras que para Flavourzyme® 500 L son 8.3 y 53.8°C. En la tabla 10 se muestran los valores obtenidos para cada una de las respuestas tanto predichas como experimentales evaluadas a estas condiciones. Es de notar la proximidad de las respuestas experimental con las predichas, lo cual corrobora la validez de los modelos obtenidos y la potencia de la metodología de superficie de respuesta como método de optimización. Sin embargo, dicho ajuste entre valores predichos y experimentales es mejor en el caso de la Alcalase® 2.4 L respecto a la Flavourzyme® 500 L.

Tabla 10. Valores predichos y experimentales para P y GH usando Alcalase® 2.4 L y Flavourzyme® 500 L en las condiciones óptimas de pH y T.

Enzima	Predicho		Experimental		Error absoluto		REP (%)
	P (g/L)	GH (%)	P (g/L)	GH (%)	P (g/L)	GH (%)	
Alcalase® 2.4 L	6.9	17.6	6.7 ± 0.2	16.7 ± 0.3	0.2	0.9	86.3
Flavourzyme® 500 L	5.3	6.4	3.6 ± 0.2	5.9 ± 0.2	1.7	0.5	66.3

P: Concentración de proteína soluble (g/L)

GH: Grado de hidrólisis (%)

T: Temperatura (°C)

REP (%) es el rendimiento de la extracción de proteína y es calculado como el cociente entre la proteína final y la proteína inicial (8 g/L) multiplicado por 100.

El error absoluto es calculado la diferencia entre el valor predicho y el valor experimental en valor absoluto.

En la tabla 10 se observa que se obtuvieron mayores GH y rendimientos de extracción de proteína (REP) usando Alcalase® 2.4 L, lo cual concuerda con Gajanan et al., (2016) ya que en la medida en que el GH es mayor, el rendimiento también se incrementa. Borges et al., (2019) encontró resultados similares en procesos de hidrólisis con harina de esqueletos de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) indicando que el GH es mayor para la Alcalase® 2.4 L dado que es una endopeptidasa, mientras que la Flavourzyme® 500 L es exopeptidasa. Estos valores mayores para Alcalase® 2.4 L, también pueden deberse a que las proteasas alcalinas, muestran actividades mayores que las proteasas neutras como Flavourzyme® 500 L, cuando actúan sobre proteínas de pescado (Dumay et al., 2006; Gunasekaran et al., 2015; Klompong et al., 2008; Yarnpakdee et al., 2015). El mayor grado de hidrólisis en estos sustratos, tiene importancia

porque puede estar asociado al incremento de los niveles de aminoácidos esenciales, por ende, del valor nutricional de los productos hidrolizados obtenidos (Kechaou et al., 2009; Yarnpakdee et al., 2015). En general, altos GH en hidrolizados de subproductos pesqueros han sido vinculados con mayor capacidad reductora y de captura de radicales (García-Moreno et al., 2014; Gómez et al., 2019) debido a sus bajos pesos moleculares (W. Liu et al., 2013; Picot et al., 2010; Wang et al., 2013). Las aplicaciones más interesantes en este aspecto se han encontrado en péptidos con pesos moleculares entre 1 – 4 kDa (de Castro & Sato, 2015; Opheim et al., 2015; Saidi et al., 2014). Por lo tanto, obtener hidrolizados con GH mayores al 10% incrementa la posibilidad de obtener péptidos bioactivos (Beaubier et al., 2019; Gómez et al., 2013).

4.4.3 Efecto del tipo de enzima sobre la actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos

Para evaluar el efecto del tipo de enzima usada en la hidrólisis sobre la actividad antioxidante y quelante de hierro de los hidrolizados obtenidos bajo las condiciones óptimas determinadas en el apartado anterior, (pH, T) Alcalase® 2.4 L (8.1 y 58.5°C), y Flavourzyme® 500 L (8.3 y 53.8°C), se usó el método ABTS, FRAP y AQH (Tabla 11). Al comparar las actividades antioxidantes de los hidrolizados de estas dos enzimas, se observa que la actividad antioxidante específica de los hidrolizados obtenidos con Flavourzyme® 500 L son mayores que los del Alcalase® 2.4 L, pero se debe considerar que la cantidad de enzima utilizada en ambos casos no es la misma; por tal razón se calculó la eficiencia en términos del número de unidades de actividad específica por unidad de volumen de enzima gastada. Lo cual permite hacer una comparación más útil a la hora de definir con cual enzima llevar a cabo procesos a nivel comercial. La comparación de las eficiencias en los términos mencionados, indica que la Alcalase® 2.4 L es la enzima más eficiente a la hora de producir hidrolizados antioxidantes. En el caso de la actividad quelante de hierro no hubo diferencias significativas entre las enzimas.

Tabla 11. Actividades antioxidantes de los hidrolizados enzimáticos de escamas de tilapia roja usando Alcalase® 2.4 L y Flavourzyme® 500 L

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		Alcalase® 2.4 L	Flavourzyme® 500 L
ABTS	Actividad (µmol ET/g prot)	223.1 ± 4.9 ^a	461.9 ± 4.8 ^b

	Eficiencia ($\mu\text{mol ET/g prot} \cdot \text{mL enzima}$)	106.9 ± 2.3^a	53.7 ± 0.6^b
FRAP	Actividad ($\mu\text{mol ET/g prot}$)	27.2 ± 1.4^a	54.2 ± 3.1^b
	Eficiencia ($\mu\text{mol ET/g prot} \cdot \text{mL enzima}$)	13.1 ± 0.7^a	6.3 ± 0.4^b
AQH	Porcentaje de actividad	61 ± 1^a	65 ± 3^a
	Eficiencia ($\% / \text{mL enzima}$)	0.97 ± 0.1^a	0.22 ± 0.1^b

ABTS: Actividad antioxidante por medio del método ABTS ($\mu\text{M ET/L}$)

FRAP: Actividad antioxidante por medio del método FRAP ($\mu\text{M ET/L}$)

AQH: Actividad quelante de hierro ($\%$)

La eficiencia fue calculada para ABTS y FRAP como el cociente de la actividad $\mu\text{mol ET/g prot}$ y el volumen de enzima usada (mL) y para AQH el cociente de la actividad en $\%$ y el volumen de enzima usada (mL)

Los datos son expresados como media \pm DS de tres experimentos independientes. Las letras indican diferencias estadísticas significativas (valor $p < 0.05$) entre las enzimas.

Los resultados de la tabla 11 ponen en evidencia que el tipo de proteasa afecta la funcionalidad de los hidrolizados obtenidos, lo cual concuerda con los resultados de Karamac et al., (2016) quienes obtuvieron que Alcalase® 2.4 L fue superior en términos de actividad antioxidante. En este caso la diferencia se debe a que la Alcalase® 2.4 L es una endopeptidasa que rompe enlaces peptídicos al interior de la cadena peptídica, mientras que la Flavourzyme® 500 L es una exopeptidasa que corta al final de la cadena peptídicas (Ambigaipalan & Al-khalifa, 2015). En este sentido, Alcalase® 2.4 L genera mayores residuos con aminoácidos hidrofóbicos, que han sido asociados con actividades antioxidantes debido a la abundancia de electrones que pueden ser donados para estabilizar los radicales libres (Girgih et al., 2015; Gómez et al., 2019). De la misma forma los aminoácidos aromáticos como tirosina y fenilalanina han sido asociados con el incremento del potencial antioxidante gracias a la habilidad para donar protones (Silveira Coelho et al., 2019), así mismo, aminoácidos con residuos ácidos como el ácido glutámico tienen altas contribuciones a la actividad antioxidante de los hidrolizados (Udenigwe & Aluko, 2011). Resultados similares fueron reportados por Karamac et al., (2016) quienes demostraron que Alcalase® 2.4 L fue superior a la Flavourzyme® 500 L en términos de actividad antioxidante.

Teniendo en cuenta los mayores rendimientos de extracción de proteínas y GH que entrega la Alcalase® 2.4 L, así como sus mayores eficiencias de hidrolizados con capacidad antioxidante, se concluye que la Alcalase® 2.4 L es la enzima con mayor potencial para obtener péptidos antioxidantes a partir de las escamas de tilapia roja.

4.4.4 Parámetros cinéticos de la hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja usando Alcalase® 2.4 L

Para definir completamente las condiciones de operación de la hidrólisis enzimática, es necesario definir las concentraciones de enzima y sustrato en las que la enzima pueda tener su mejor desempeño. En tal sentido es conveniente determinar los parámetros cinéticos de Alcalase® 2.4 L con este sustrato en particular, por medio de una curva de saturación, en la cual se grafica la velocidad inicial vs la concentración de sustrato (Copeland & Wiley, 2000; Valencia et al., 2014) En la Figura 16 se observa que si la concentración de sustrato es superior a 200 mM, la velocidad de reacción es constante con incrementos de sustrato, debido al fenómeno de saturación de la enzima.

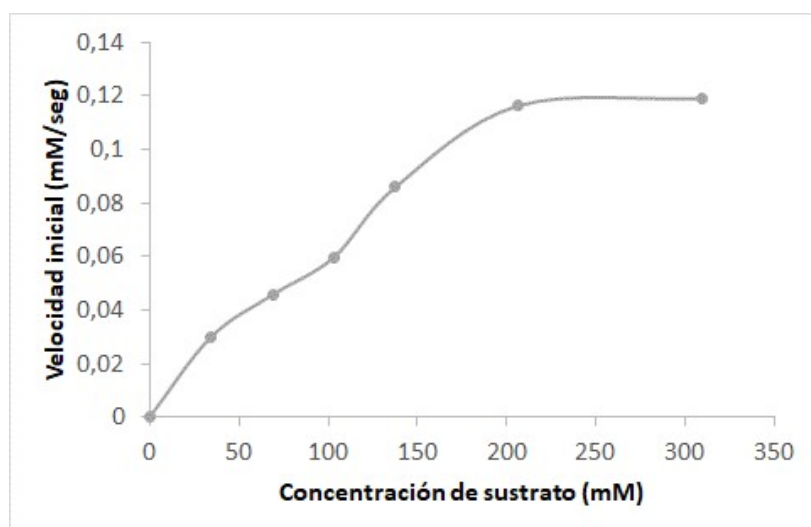


Figura 16. Curva de saturación de Alcalase® 2.4 L: La velocidad inicial (mM/seg) vs concentración de proteína (mM).

Los parámetros cinéticos se determinan usando el modelo Lineweaver-Burk graficando los inversos multiplicativos de las variables anteriormente mencionadas (Valencia et al., 2014), luego de ajustar un modelo lineal a esta curva se obtienen los valores de la pendiente y el intercepto, con lo cual se calcula V_{max} : 11.312 mM/seg y K_m : 188.25 mM o 21.8 g/L. Con base en esto se define el rango de concentraciones de sustrato en las que no se presentará la inhibición por sustrato, como los valores entre $0.5K_m$ y $2.5K_m$ (Copeland & Wiley, 2000).

Los valores altos K_m indican que la enzima requiere altas concentraciones de sustrato para llegar a la saturación y lograr la velocidad máxima, este parámetro está asociado con la afinidad que hay entre la enzima y el sustrato (Lin et al., 2017). Altos valores de K_m indican baja afinidad. En tal sentido, el valor obtenido de K_m para el sustrato en estudio es mayor que el obtenido para la Alcalase® 2.4 L en otros sustratos como es el caso de vísceras de tilapia (1.9 g/L) (Zapata Montoya et al., 2018) y el músculo de salmón (4 g/L) (Valencia et al., 2014), posiblemente por la diferencia en estructura de la escama, con mayor contenido mineral como es el caso de la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Okuda et al., 2011), lo cual hace que sea una estructura resistente a las proteasas (Zhang et al., 2019).

4.4.5 Efecto de S y E sobre la hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja

Por medio de un diseño central compuesto se evaluó el efecto de las concentraciones de enzima (E) y sustrato (S), sobre P, GH y las actividades biológicas ABTS y AQH. Los resultados de las corridas se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Diseño central compuesto para concentración de sustrato y enzima en Alcalase® 2.4 L

Corrida	S(g/L)	E(g/L)	P (g/L)	GH (%)	ABTS ($\mu\text{mol ET/g prot}$)	AQH (%)
1	30.0	6.7	25.7	17.1	233.2	80.0
2	30.0	3.0	24.3	15.1	220.0	78.0
3	45.0	0.4	39.5	10.8	220.5	72.9
4	30.0	3.0	24.8	16.0	247.3	81.7
5	51.2	3.0	39.0	13.7	263.4	75.3
6	15.0	5.6	14.4	18.5	311.1	87.4
7	8.8	3.0	8.5	16.6	306.0	85.2
8	15.0	0.4	14.8	13.8	112.3	86.5
9	30.0	3.0	27.2	16.1	222.0	83.7
10	30.0	0.0	10.2	0.7	69.3	41.0
11	30.0	3.0	26.6	16.8	220.7	87.7
12	30.0	3.0	26.2	16.4	251.6	88.3

13 45.0 5.6 36.1 15.9 280.2 81.1

S: Concentración de sustrato (g/L)

E: Concentración de enzima (g/L)

P: Concentración de proteína soluble (g/L)

GH: Grado de hidrólisis (%)

ABTS: Actividad antioxidante por medio del método ABTS ($\mu\text{M ET/g prot}$)

AQH: Actividad quelante de hierro (%)

En la tabla 13 se muestra que los modelos de todas las respuestas fueron significativos, con carencia de ajuste no significativa. Sin embargo, para los modelos de P y AQH solo fue significativa la concentración de sustrato, mientras que para el GH los efectos lineales de ambos factores fueron significativos y el término cuadrático de la concentración de sustrato. Finalmente, el ABTS es explicado por los efectos lineales de E, cuadráticos de S, E y la interacción S*E.

Tabla 13. ANOVA para el efecto de la concentración de sustrato y enzima en Alcalase® 2.4 L

Variable	P (g/L)	GH (%)	ABTS	AQH
Modelo	< 0.0001	< 0.0001	0.0013	0.0094
S	< 0.0001	0.0072	0.8243	0.0094
E		< 0.0001	0.0002	
S ²		0.0103	0.0132	
E ²			0.0060	
S*E			0.0332	
Carencia de ajuste	0.3047	0.1549	0.0730	0.7405
R ²	0.9787	0.8937	0.9147	0.5065
R ² ajustado	0.9766	0.8582	0.8538	0.4571

S: Concentración de sustrato (g/L)

E: Concentración de enzima (g/L)

P: Concentración de proteína soluble (g/L)

GH: Grado de hidrólisis (%)

ABTS: Actividad antioxidante por medio del método ABTS ($\mu\text{M ET/g prot}$)

AQH: Actividad quelante de hierro (%)

A partir del ANOVA (Tabla 13), se obtuvieron los modelos para cada una de las respuestas (ecuaciones 21, 22, 23 y 24), luego de eliminar los términos no significativos, sin afectar la jerarquía del diseño.

$$(GH)^{255} = 1163.1 - 204.9 S + 488.3E - 231.9 E^2 \quad (21)$$

$$P = 25.6 + 11.2 S \quad (22)$$

$$ABTS = 230.8 + 2.1 S + 68.7 E - 35.0 E * S + 33.0 S^2 - 43.9 E^2 \quad (23)$$

$$AQH = 82.3 - 4.2 S \quad (24)$$

En la figura 17 se muestran las superficies de respuesta de los modelos encontrados para cada una de las variables respuesta (ecuaciones 21-24). En ella se observa que S favorece a P, pero desfavorece AQH. Mientras que la E favorece ABTS y GH. Adicionalmente, el aumento de E favorece al GH, posiblemente debido a que favorece la formación del complejo enzima-sustrato (Copeland & Wiley, 2000). Más interesante es el efecto de E sobre ABTS, el cual además tiene el modelo con mayores efectos por parte de los factores. S tiene efectos contrarios sobre ABTS según la zona de E en que se encuentre. A altos valores de E incrementos de S reducen la actividad antioxidante por ABTS. Estas diferencias en ABTS en función de S, se deben a que la afinidad de la enzima hacia la proteína está determinada por el equilibrio entre la proteína nativa y la desplegada en solución (Deng et al., 2018). Cambios en este equilibrio pueden sugerir cambios en los mecanismos de hidrólisis. A partir la curva de saturación (figura16) se demostró que la afinidad por la proteína intacta fue diferente en la hidrólisis con Alcalase® 2.4 L para distintas concentraciones de sustrato, es decir, que la composición de estos hidrolizados fue distinta y que en efecto esto se produce por cambios en la selectividad de la enzima en condiciones variadas de operación (Butré et al., 2012).

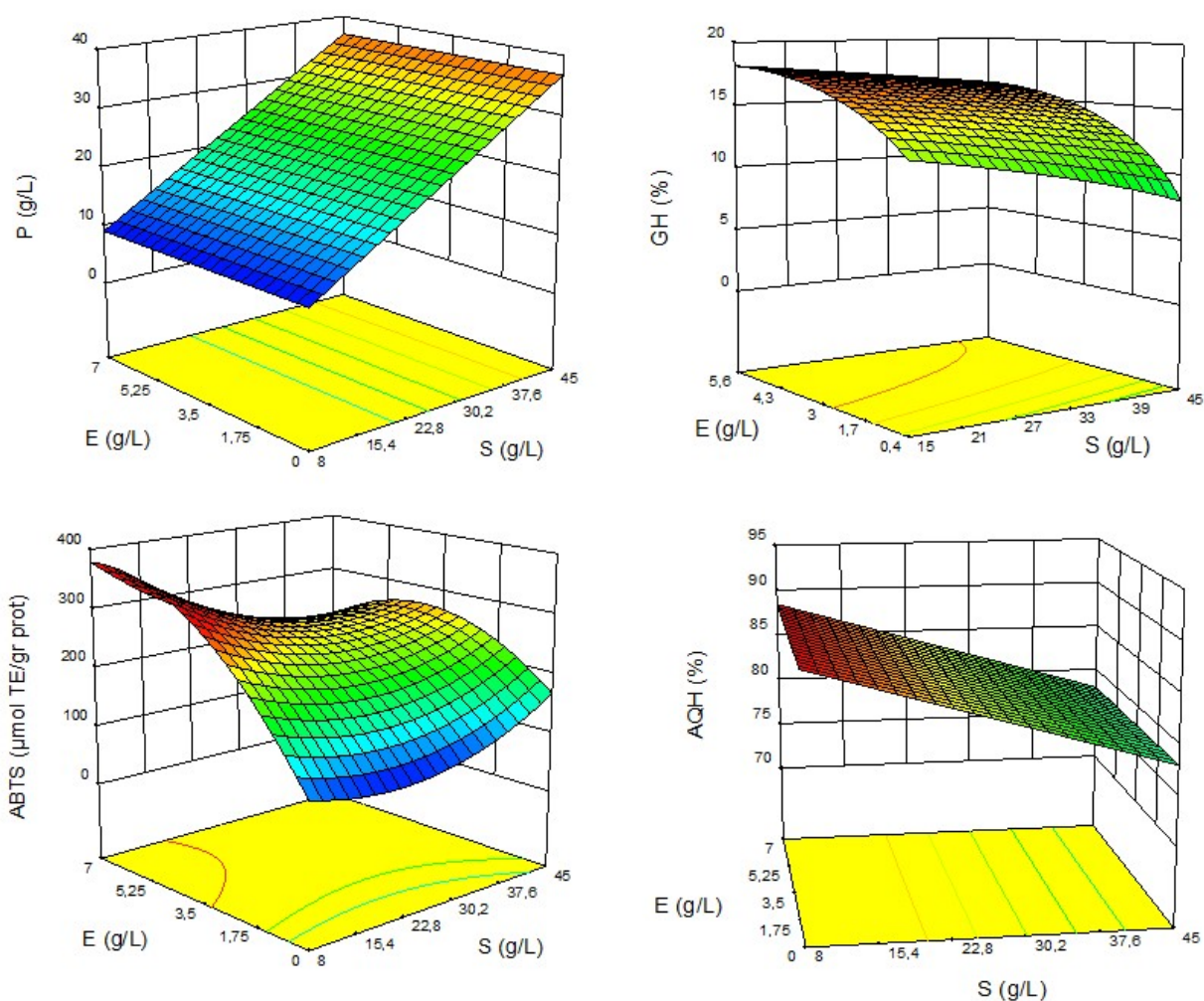


Figura 17. Gráficos 3D de superficie de respuesta para los efectos de interacción de las variables independientes S (g/L) y E (g/L) usando Alcalasa® 2.4 L sobre las variables dependientes P (g/L), GH (%), ABTS ($\mu\text{M ET/g prot}$) y AQH. (%)

Los modelos presentados en las ecuaciones 21-24 fueron optimizados para maximizar GH, P y las actividades biológicas (ABTS y AQH). Se encontró que la concentración de sustrato debería ser 45g/L y la de enzima 4.42 g/L. Las variables respuesta obtenidas fueron verificadas experimentalmente (Tabla 14)

Tabla 14. Valores predichos y experimentales para P, GH, ABTS y AQH en las condiciones óptimas de S y E.

Variable respuesta	Predicho	Experimental	Error absoluto
P (g/L)	36.8	41.9 \pm 1.2	5.1

GH (%)	15.8	15.6 ± 0.3	0.2
ABTS (μmol ET/g prot)	271.1	209.8 ± 3.0	23
AQH (%)	78.0	77.0 ± 1.4	1.0

P: Concentración de proteína soluble (g/L)

GH: Grado de hidrólisis (%)

ABTS: Actividad antioxidante por medio del método ABTS (μM ET/g prot)

AQH: Actividad quelante de hierro (%)

El error absoluto es el valor absoluto de la diferencia entre el valor predicho y experimental.

La proteína soluble luego de la hidrólisis enzimática fue 36.8 g/L y teniendo en cuenta que la concentración inicial de proteína insoluble era 45 g/L esto muestra que Alcalase® 2.4 L permite la solubilización de casi el total de la proteína, como ya ha sido reportado en otras especies de pescado (Putra et al., 2018). Por otro lado, el grado de hidrólisis obtenido es cercano al reportado por Blanco et al., (2017) en la hidrólisis de colágeno de piel de diversas especies usando Alcalase® 2.4 L, el cual fue entre 12 y 16%. Así mismos, la actividad antioxidante obtenidas son mayores a las reportadas por algunos autores como Sai-Ut et al.,(2014), quienes encontraron que la actividad antioxidante por ABTS era de 80 μmol TE/g muestra para hidrolizados de gelatina provenientes de *Aluterus monoceros* mientras que en este estudio se obtuvo 190 μmol TE/g muestra. Con respecto a AQH, los resultados obtenidos son cercanos a los reportado por Choonpicharn & Jaturasitha, (2014) quienes reportaron actividad del 77% en hidrolizados de gelatina de piel de tilapia nilótica.

4.4.6 Efecto del GH sobre la actividad antioxidante de los hidrolizados enzimáticos de escamas de tilapia roja

Bajo las condiciones óptimas de pH, T, S y E, se realizó el proceso de hidrólisis en diferentes GH (tabla 15). Se observa que el GH aumenta linealmente en los primeros 55 min y luego de este tiempo la tasa de cambio es baja, pasando de GH 16 a GH 18 en 337 min. Este comportamiento se ha atribuido a uno o varios de estos tres factores: (a) disminución en la concentración de enlaces peptídicos susceptibles a la hidrólisis por las proteasas (Kumar & Chatli, 2016) (b) posible inhibición de las enzimas causada por el sustrato de hidrólisis (Zapata Montoya et al., 2018) (c) desnaturalización térmica de la enzima (Figuroa et al., 2012).

Tabla 15. Actividad antioxidante y proteína soluble en diferentes GH de los hidrolizados enzimáticos de escamas de tilapia roja usando Alcalasa® 2.4 L

Tiempo (min)	GH (%)	P (g/L)	ABTS ($\mu\text{mol ET/g prot}$)	FRAP ($\mu\text{mol ET/g prot}$)	ORAC ($\mu\text{mol ET/g prot}$)	AQH (%)
1.2	2.0	37.2 \pm 1.3 ^a	115.6 \pm 1.1 ^a	25.7 \pm 0.1 ^a	129.5 \pm 2.0 ^a	15.8 \pm 1.3 ^a
10.0	7.0	41.4 \pm 2.0 ^b	200.5 \pm 11.7 ^b	28.4 \pm 0.9 ^b	176.6 \pm 11.8 ^b	54.9 \pm 3.4 ^b
55.0	12.0	41.9 \pm 1.2 ^b	257.5 \pm 7.0 ^c	31.9 \pm 1.6 ^c	195.0 \pm 8.8 ^c	70.7 \pm 3.4 ^c
180.0	16.0	42.1 \pm 0.9 ^b	209.8 \pm 3.0 ^b	30.2 \pm 0.2 ^c	156.5 \pm 6.8 ^d	77 \pm 1.4 ^c
517.0	18.0	43.8 \pm 1.2 ^c	289.6 \pm 1.1 ^d	29.8 \pm 0.1 ^c	141.2 \pm 18.8 ^e	85.4 \pm 2.4 ^d

P: Concentración de proteína soluble (g/L)

GH: Grado de hidrólisis (%)

ABTS: Actividad antioxidante por medio del método ABTS ($\mu\text{M ET/g prot}$)

ORAC: Actividad antioxidante por el método de ORAC ($\mu\text{M ET/ g prot}$)

AQH: Actividad quelante de hierro (%)

Los datos son expresados como media \pm DS de tres experimentos independientes. Las letras indican diferencias estadísticas significativas (valor $p < 0.05$) entre los grados de hidrólisis

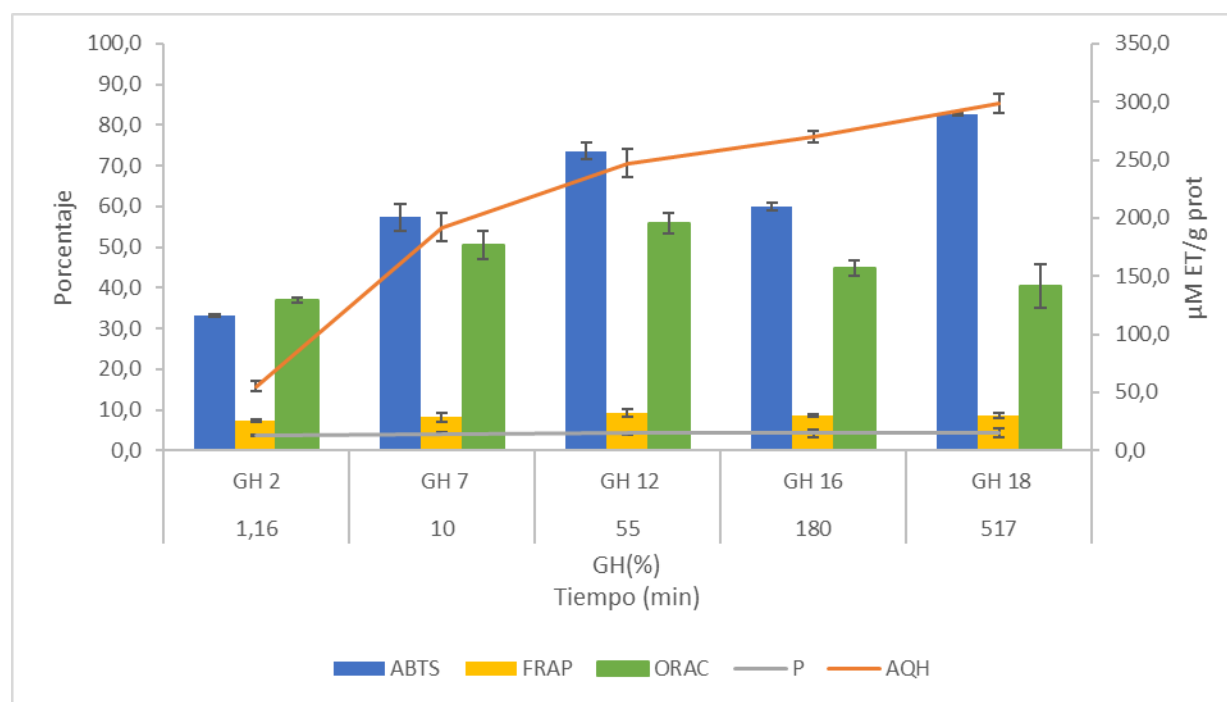


Figura 18. Actividad antioxidante y proteína soluble de los hidrolizados enzimáticos preparados usando Alcalasa® 2.4 L con diferentes GHs y tiempos.

Los resultados de la figura 18 muestran que la actividad antioxidante tiene cambios en la medida en que el GH cambia, en el caso de ABTS aumenta hasta el GH 12 y luego tiene una disminución en GH 16, para FRAP se observa que los cambios son pequeños, para ORAC hay

crecimiento hasta el GH 12 y luego cae la actividad y para AQH se observa crecimiento en el tiempo evaluado. Esto puede deberse a que diferentes péptidos se van formando y rompiendo a lo largo del proceso de hidrólisis y que en algunos casos la hidrólisis excesiva de las proteínas conlleva a una la pérdida de los péptidos con potencial antioxidante (Gómez et al., 2019) Además, en la figura 18 se puede ver que ABTS logra mejor actividad con GH 12 y 18, para FRAP en GH 12, para ORAC con GH 12 y para AQH con GH 16 y 18; este resultado permite escoger el hidrolizado con el cual se continuarán los ensayos de separación por peso molecular, es así como se elige el hidrolizado con GH 12 dado que es el hidrolizado donde la mayoría de las actividades antioxidantes tienen su máximo valor.

El hidrolizado con GH 12 fue caracterizado en su composición de aminoácidos (tabla 16). En términos generales se puede notar un perfil de aminoácidos similar tanto en las escamas como el hidrolizado enzimático, donde el aminoácido más abundante es glicina y ácido glutámico. La concentración de la mayoría de los aminoácidos decreció en el hidrolizado enzimático y esto puede darse porque la proteína cambió su estructura terciaria y cuaternaria con el proceso de hidrólisis enzimática, ocasionando que sus aminoácidos estuvieran más disponibles para la reacción de hidrólisis ácida con HCl previo a la detección de los aminoácidos por HPLC, como lo explican Wang et al., (2017) que mencionan la destrucción de aminoácidos por este proceso.

Tabla 16. Concentración relativa de aminoácidos en el hidrolizado enzimático GH 12 de escamas de tilapia roja

Aminoácidos	residuos/1000 residuos
Aminoácidos esenciales	
Histidina	15.4
Treonina	5.8
Arginina	2.4
Valina	18.2
Metionina	5.9
Fenilalanina	4.1
Isoleucina	13.1
Leucina	4.8
Lisina	10.0
Aminoácidos no esenciales	

Ácido aspártico	33.3
Ácido glutámico	56.7
Asparagina	4.0
Serina	32.4
Glicina	610.3
Citrulina	18.9
Alanina	3.9
Tirosina	90.4
Cisteína	6.6
Prolina	38.1
Hidroxiprolina	26
Porcentaje de aminoácidos esenciales	8.0
Porcentaje de aminoácidos no esenciales	92.0

Los péptidos de escamas pueden poseer buena actividad antioxidante gracias a la presencia de aminoácidos aromáticos tales como fenilalanina y tirosina, además de la presencia de histidina, prolina, metionina, lisina y cisteína, que han sido asociados con actividad antioxidante a través de su habilidad para donar protones o electrones (Je et al., 2015).

En el caso del hidrolizado se observa que la proporción de aminoácidos aromáticos y no esenciales aumentaron respecto a la materia prima, esto se debe a que luego de los procesos de hidrólisis queda más disponible químicamente para ser cuantificado, contrario a los aminoácidos hidrofóbicos y esenciales que disminuyeron en el hidrolizado, lo cual puede deberse al deterioro por las condiciones extremas que se tienen en la hidrólisis ácida previa a la cuantificación de los aminoácidos (Cigić et al., 2008).

4.5 Escalado de hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja

En el proceso de escalado se debe probar que, en la mayor escala, se alcancen los mismos resultados en cuanto a eficiencia y calidad, que se obtienen a pequeña escala, sin embargo, el escalado de las hidrólisis de proteínas de pescado ha sido poco estudiado (Zapata et al., 2019). Una vez escalado el proceso a 7.5 L, se observó que las actividades diferían de las obtenidas en 0.5 L, por lo que se modificó la velocidad de agitación, para determinar el efecto de esta variable sobre las respuestas. En la tabla 17 se presentan los resultados de las variables evaluadas para el

reactor de 7.5 L, con dos velocidades de agitación diferentes (250 y 350 rpm), en contraste con los resultados obtenidos a 0.5 L a 560 rpm.

Al aplicar el criterio de escalado se encontró que la velocidad debería ser 250 rpm (sección 3.7) sin embargo, los resultados obtenidos a esta condición de agitación no reprodujeron los obtenidos en el reactor de 0.5 L, posiblemente por deficiencias en la convección obtenida en el sistema de 7.5 L. Por tal razón se evaluó una condición de agitación que mejorara la convección (350 rpm).

En la tabla 17 se observa que el GH se conserva en función del tiempo (12% para 55 min) cuando se cambia de escala y se agita a 350 rpm, sin embargo, P y ABTS decrecen, mientras que FRAP aumentó y AQH no cambió significativamente (valor $p < 0.05$). Estos resultados señalan que al cambiar de escala y agitación se pueden presentar cambios en la actividad antioxidante lo cual puede explicarse por cambios conformacionales que sufre la enzima cuando se le somete a condiciones de flujo diferentes (Gómez & Zapata, 2017).

Tabla 17. Efecto del cambio de escala sobre las propiedades de los hidrolizados enzimáticos de escamas de tilapia roja

Velocidad de agitación (rpm)	GH (%)	P (g/L)	ABTS ($\mu\text{mol ET/g prot}$)	FRAP ($\mu\text{mol ET/g prot}$)	AQH (%)
250	9.9 ^a	30.3 \pm 1.3 ^a	245.3 \pm 10.7 ^a	38.7 \pm 2.5 ^a	33.4 \pm 5.1 ^a
350	12.0 ^b	37.4 \pm 1.5 ^b	199.8 \pm 8.5 ^b	40.3 \pm 3.1 ^a	66.2 \pm 4.8 ^b
Reactor 500 mL	12.0 ^b	41.9 \pm 1.2 ^c	257.5 \pm 7.0 ^c	28.4 \pm 5.6 ^b	70.7 \pm 3.4 ^b

P: Concentración de proteína soluble (g/L)

GH: Grado de hidrólisis (%)

ABTS: Actividad antioxidante por medio del método ABTS ($\mu\text{M ET/g prot}$)

FRAP: Actividad antioxidante por el método de FRAP ($\mu\text{M ET/g prot}$)

AQH: Actividad quelante de hierro (%)

Los datos son expresados como media \pm DS de tres experimentos independientes. Las letras indican diferencias estadísticas significativas (valor $p < 0.05$) entre las velocidades de agitación

4.6 Purificación de los hidrolizados

4.6.1 Efecto de la sal sobre la actividad antioxidante del hidrolizado alcalino

Durante el proceso de hidrólisis de alcalina se adicionan grandes cantidades de NaOH para la solubilización de las proteínas, luego el hidrolizado que estaba a pH 13 debe ser ajustado a pH 7 por la adición de ácidos, lo cual genera altos contenidos de sal que deben ser removidos dado que esta puede reducir el valor biológico de la proteína o la concentración de aminoácidos (Drummond et al., 2019).

Luego de la hidrólisis alcalina y centrifugado, el pH de los hidrolizados es ajustado a 7 para la evaluación de la actividad antioxidante, con esta neutralización se forman sales que pueden interferir con la medición y se hace necesario la remoción de la sal. Se evaluó el efecto de la sal en las pruebas químicas de la actividad antioxidante ABTS y FRAP. En la tabla 18 se observan los resultados de las pruebas antioxidantes con y sin sal en el hidrolizado alcalino óptimo obtenido en el proceso durante 2h con NaOH 2M en 500 mL.

Tabla 18. Efecto del contenido de sal en las actividades antioxidantes (ABTS y FRAP) en el hidrolizado alcalino de escamas de tilapia roja

Prueba antioxidante	Sin Sal	Con sal
ABTS ($\mu\text{M ET/L}$)	821.9 ± 10.8^a	1722.6 ± 72.4^b
FRAP ($\mu\text{M ET/L}$)	1080.4 ± 60.1^a	178.9 ± 10.3^b

ABTS: Actividad antioxidante por medio del método ABTS ($\mu\text{M ET/g prot}$)

FRAP: Actividad antioxidante por el método de FRAP ($\mu\text{M ET/ g prot}$)

El hidrolizado óptimo alcalino fue desalado por una columna de cartucho C18 Sep-Pak® Vac, 35cc.

Los datos de la actividad antioxidante son expresados como media \pm DS de tres experimentos independientes. Las letras indican diferencias estadísticas significativas (valor $p < 0.05$) en las muestras de cada hidrolizado con y sin sal.

Los resultados de la tabla 18 muestra que las actividades antioxidantes se ven afectadas por el contenido de sal en el hidrolizado, en el caso de ABTS son más altos con sal y para FRAP sin sal. Con esto se evidencia que la solución donde están solubilizados los péptidos afecta la medición, este comportamiento fue estudiado por Abramovič et al., (2017) quienes encontraron que la solución donde se disuelven los péptidos es responsable de la transferencia de electrones y átomos de hidrogeno que son característicos en la transferencia secuencial de electrones con pérdida de protones (SPLET), en la transferencia de átomos de hidrógeno y en la transferencia de

electrones acoplados a protones. De acuerdo con estos resultados se decide continuar con el hidrolizado alcalino sin sal en los análisis posteriores.

4.6.2 Fraccionamiento de los hidrolizados enzimático y alcalino

Se procede con el fraccionamiento de los hidrolizados alcalino y enzimático obtenidos con las mejores condiciones de acuerdo con los resultados previos, para esto se usaron membranas de ultrafiltración son muy útiles para la purificación de los péptidos porque el tamaño de estos puede controlarse según el tipo de membrana utilizada, otros autores han reportado el uso de las membranas para obtener péptidos con alta actividad antioxidante (Oh et al., 2019). En la tabla 19 se observan los resultados de las pruebas antioxidantes de las fracciones de hidrolizado alcalino luego de la remoción de sal.

Tabla 19. Actividad antioxidante de las fracciones de diferente peso molecular del hidrolizado alcalino de escamas de tilapia roja

Fracción	ABTS ($\mu\text{M ET/gr prot}$)	FRAP ($\mu\text{M ET/gr prot}$)	ORAC ($\mu\text{M ET/gr prot}$)
Hidrolizado	410.9 \pm 5.4 ^a	200.9 \pm 11.2 ^a	199.2 \pm 10.9 ^a
> 100	320.6 \pm 10.5 ^b	98.2 \pm 20.2 ^b	373.9 \pm 27.9 ^b
10-100	712.0 \pm 9.6 ^c	106.1 \pm 4.7 ^c	259.5 \pm 10.7 ^c
3-10	624.3 \pm 13.3 ^d	203.3 \pm 12.7 ^a	125.1 \pm 2.4 ^d
<3	314.1 \pm 4.7 ^b	89.1 \pm 1.9 ^c	208.6 \pm 5.2 ^e

ABTS: Actividad antioxidante por medio del método ABTS ($\mu\text{M ET/g prot}$)

FRAP: Actividad antioxidante por el método de FRAP ($\mu\text{M ET/ g prot}$)

ORAC: Actividad antioxidante por el método de ORAC ($\mu\text{M ET/ g prot}$)

Los datos son expresados como media \pm DS de tres experimentos independientes. Las letras indican diferencias estadísticas significativas (valor $p < 0.05$) entre las fracciones

El fraccionamiento del hidrolizado alcalino no fue efectivo en el caso de la FRAP dado que no se logró una fracción que fuera mayor en actividad que el hidrolizado, sin embargo, en la prueba ABTS si se obtienen fracciones como 10-100 kDa y 3-10 kDa con actividades mayores que el hidrolizado completo, por otro lado, en ORAC se obtuvo que la fracción con mayor actividad es >100 kDa. En estos resultados se observan que las fracciones con mayor peso presentan mejor actividad antioxidante, lo cual es contrario a lo reportado por otros autores, donde los pesos moleculares son menores a 3 kDa (Phongthai et al., 2017).

En la tabla 20 se muestran los resultados de las actividades antioxidantes de las fracciones de hidrolizado enzimático.

Tabla 20. Actividad antioxidante de las fracciones de diferente peso molecular del hidrolizado enzimático GH 12

Fracción	ABTS ($\mu\text{M ET/gr prot}$)	FRAP ($\mu\text{M ET/gr prot}$)	ORAC ($\mu\text{M ET/gr prot}$)
Hidrolizado	214.2 \pm 3.2 ^a	33.6 \pm 1.3 ^a	195.0 \pm 9.3 ^a
> 100	181.4 \pm 1.1 ^b	117.3 \pm 11.7 ^b	69.8 \pm 3.8 ^b
10-100	237.8 \pm 1.6 ^c	175.9 \pm 5.6 ^c	101.7 \pm 14.6 ^c
3-10	118.3 \pm 4.8 ^d	90.2 \pm 0.9 ^d	73.2 \pm 11.7 ^d
<3	299.6 \pm 4.4 ^e	155.5 \pm 1.4 ^e	158.8 \pm 25.3 ^e

ABTS: Actividad antioxidante por medio del método ABTS ($\mu\text{M ET/g prot}$)

FRAP: Actividad antioxidante por el método de FRAP ($\mu\text{M ET/ g prot}$)

ORAC: Actividad antioxidante por el método de ORAC ($\mu\text{M ET/ g prot}$)

Los datos son expresados como media \pm DS de tres experimentos independientes. Las letras indican diferencias estadísticas significativas (valor $p < 0.05$) entre las fracciones

Como se muestra en la tabla 20. en el ABTS la fracción con mayor actividad es <3kDa mientras que en FRAP es la fracción de 10-100 kDa y por otro lado en ORAC es el hidrolizado completo. Considerando que los valores de actividad antioxidante para la fracción <3kDa (ABTS) y 10-100 kDa (FRAP) son mayores que los alcanzados con el hidrolizado, los resultados sugieren que el fraccionamiento por peso molecular es una técnica efectiva para separar los péptidos antioxidantes. Este resultado coincide con Hamzeh et al., (2019) quienes reportaron que la separación en fracciones de diferente peso molecular a partir de hidrolizados de proteínas aisladas de manto y piel de calamar, permitió obtener péptidos antioxidantes con una capacidad promedio de neutralizar radicales ABTS de 318 $\mu\text{mol ET/g}$ de proteína, la cual fue superior en más de 4 veces a la actividad presentada por los hidrolizados completos. En el caso de ORAC dado que las fracciones presentan menor actividad esta técnica no es efectiva para la separación de fracciones con mayor actividad antioxidante.

Considerando los resultados de la tabla 19 y 20 en comparación, se observa que el hidrolizado alcalino presenta mejor actividad antioxidante que el hidrolizado enzimático usando el método ABTS, FRAP y ORAC, con esto podría asumirse que el hidrolizado alcalino es el

adecuado para las siguientes etapas de purificación, sin embargo, se evaluó en líneas celulares para confirmar si este comportamiento es similar.

4.7 Efecto citotóxico de los hidrolizados alcalino y enzimático en la viabilidad y crecimiento de las células A7r5.

Para evaluar el efecto citotóxico de los hidrolizados enzimático y alcalino en la viabilidad y crecimiento de las células A7r5 se usó el ensayo Alamar Blue que mide la citotoxicidad/proliferación celular, si el valor es inferior al 80% esto indica que los hidrolizados tienen un efecto tóxico en las células y no podrían ser evaluados en otro tipo de pruebas (Zhao et al., 2019). La tabla 21 se muestra que los hidrolizados enzimático, alcalino y sus fracciones no son tóxicos para las células, aquellos resultados donde el porcentaje es mayor al 100% quiere indicar que se promueven el crecimiento. Según Gómez et al., (2019) los hidrolizados pueden afectar la presión osmótica de las células debido a las cargas eléctricas, interacciones electrostáticas, enlaces químicos secundarios y otros, que pueden provocar una disminución en la viabilidad celular. De acuerdo con los resultados anteriores, estos hidrolizados podrían, ser antioxidantes que controlarían la generación de ROS en el sistema celular.

Tabla 21. Porcentaje de viabilidad celular

Muestras	Hidrolizado alcalino	Hidrolizado enzimático
Control		100
Hidrolizado	88 ± 0.7 ^a	88 ± 2.6 ^a
>100	91 ± 0.7 ^{ab}	99 ± 9.9 ^b
10-100	87 ± 1.4 ^a	127 ± 1.7 ^c
3-10	103 ± 2.3 ^c	128 ± 4.0 ^c
<3	92 ± 3.1 ^b	136 ± 7.3 ^d

Las células A7r5 fueron tratadas con los hidrolizados alcalino, enzimáticos y sus fracciones en una concentración de proteína de 2mg/mL, el control corresponde a las células no tratadas con los hidrolizados.

Los datos son expresados como media ± DS de tres experimentos independientes. Las letras indican diferencias estadísticas significativas (valor $p < 0.05$) entre las fracciones

4.8 Evaluación de la actividad antioxidante sobre células A7r5

4.8.1 Efecto de los hidrolizados contra el estrés oxidativo sobre células A7r5

La acumulación intracelular de ROS en las células A7r5 incubadas con los hidrolizados alcalino y enzimático con/sin estrés oxidativo fue analizada usando DHE (dihidroetidio); el efecto protector se evidencia cuando la medida de la fluorescencia es inferior al control con estrés oxidativo (Ang II) (Lin et al., 2017).

Los resultados de la tabla 22 muestran que la incubación por 30 min con el hidrolizado enzimático a 2mg/mL en ausencia de estrés oxidativo, no modificó significativamente los niveles intracelulares de ROS en las células A7r5 ($p < 0.05$). Por el contrario, las células tratadas con el hidrolizado alcalino mostraron un aumento en los niveles de ROS.

Tabla 22. Medias de las intensidades de fluorescencia luego del estrés oxidativo en las células del músculo liso vascular (A7r5) y la acción de los hidrolizados completos

Muestra	Promedio
Control	100 ^a
Alcalino	108.9 ± 9.4 ^b
Enzimático	100.2 ± 9.8 ^a
Ang II	148.9 ± 9.8 ^c
Alcalino+ Ang II	123.1 ± 9.6 ^d
Enzimático + Ang II	102.1 ± 8.8 ^{ab}

Las células A7r5 fueron pretratadas con los hidrolizados alcalino y enzimático en una concentración de proteína de 2mg/mL durante 1h, luego fueron tratadas con AngII 1 μ M por 1 hora. El control corresponde a las células no tratadas con los hidrolizados.

Los datos son expresados como media \pm DS de tres experimentos independientes. Las letras indican diferencias estadísticas significativas (valor $p < 0.05$) entre las muestras.

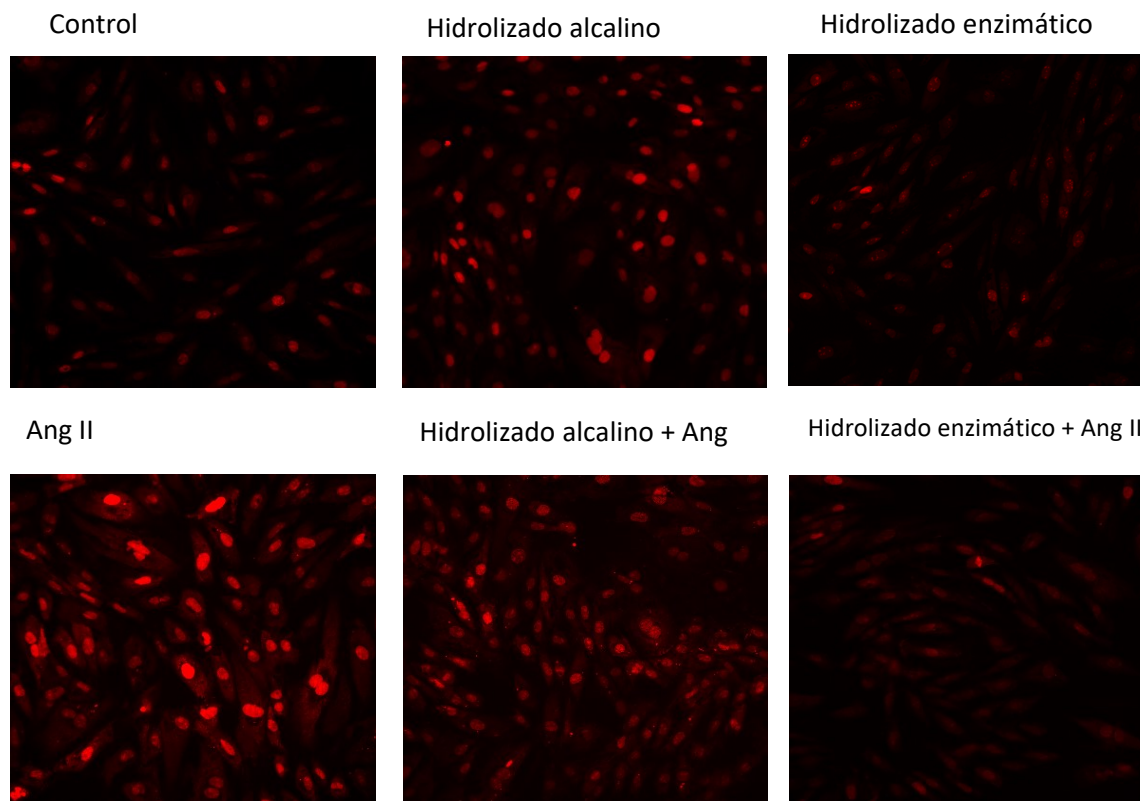


Figura 19. Efecto antioxidante de los hidrolizados alcalino y enzimático en las células del músculo liso vascular (A7r5).

Las células A7r5 se pretrataron con 50 μM de los hidrolizados durante 1 h antes de 30 min de estimulación con 1 μM de Ang II. Las células se trataron con 10 μM de DHE durante 30 min, luego se visualizaron mediante microscopía fluorescente. Las imágenes fueron tomadas 100x de magnificación.

En la figura 19 se aprecia que el hidrolizado alcalino no inhibe el estrés oxidativo en comparación con el hidrolizado enzimático, los resultados de la tabla 22 así lo corroboran, dado que la medida de intensidad de fluorescencia es mayor en el hidrolizado alcalino indicando que la célula está más afectada.

Las ROS al ser moléculas inestables, altamente reactivas (De Lucca Camargo & Touyz, 2019) conducen al estrés oxidativo, provocando diversos daños celulares y tisulares, contribuyendo a muchos tipos de enfermedades como la hipertensión, la diabetes y muchas otras (Chen et al., 2018; de Lucca Camargo & Touyz, 2019). En las células A7r5, Ang II activa la producción de ROS principalmente a través del receptor de tipo 1 de Ang II (Fan et al., 2021).

De acuerdo con los resultados anteriores se podría inferir que los péptidos intervienen en la activación de Ang II evitando la producción de ROS.

Por otro lado, si se comparan las pruebas antioxidantes *in vitro* en células con las pruebas químicas (tabla 19 y 20) indicaban que el hidrolizado alcalino presentaba mejores resultados en comparación con el enzimático, sin embargo, el comportamiento que se observa en el análisis con células (tabla 22) es opuesto, el hidrolizado enzimático resulta ser más protector del estrés oxidativo, con esto se puede concluir que hay una diferencia importante entre las pruebas antioxidantes *in vivo* e *in vitro*, esto concuerda con los resultados de varios autores que han encontrado que los cultivos celulares son una herramienta útil para evaluar el efecto sobre la salud de los hidrolizados y que los métodos químicos son limitados porque no reflejan las condiciones fisiológicas celulares (De Oliveira et al., 2020; Power et al., 2013; Silveira Coelho et al., 2019).

4.8.2 Efecto de las fracciones de los hidrolizados alcalino y enzimático contra el estrés oxidativo sobre células VSMC

Los péptidos con actividad antioxidante son generalmente péptidos pequeños con un peso molecular inferior a 1 kDa (Zou et al., 2016), sin embargo, algunas investigaciones mostraron que las fracciones con un peso molecular más alto, como 3-10 kDa, también demostraron una alta actividad antioxidante (Hamzeh et al., 2019).

Las fracciones de peso molecular de los hidrolizados alcalino y enzimático se evalúan en la línea celular dado que los procesos de purificación podrían ayudar a la obtención de péptidos protectores del estrés oxidativo. En la tabla 23 se observan los resultados de la evaluación de la protección de las fracciones alcalinas en la línea celular A7r5.

Tabla 23. Medias de las intensidades de fluorescencia luego del estrés oxidativo en las células del músculo liso vascular (A7r5) y acción de las fracciones del hidrolizado alcalino

Muestra	MIF (%)
Control	100.0 ^a
Ang II	148.9 ± 9.8 ^b
Hidrolizado	123.1 ± 9.6 ^c
>100 kDa	207.2 ± 7.4 ^d
10-100 kDa	145 ± 10.1 ^b
3-10 kDa	134.2 ± 19.4 ^e
<3 kDa	139.5 ± 17.9 ^e

Las células A7r5 fueron pretratadas con los hidrolizados alcalino y sus fracciones en una concentración de proteína de 2mg/mL durante 1h, luego fueron tratadas con AngII 1µM por 1 hora. El control corresponde a las células no tratadas con los hidrolizados.

Los datos son expresados como media ± DS de tres experimentos independientes. Las letras indican diferencias estadísticas significativas (valor $p < 0.05$) en las muestras de cada hidrolizado.

Los resultados de la tabla 23 muestran que el hidrolizado alcalino y sus fracciones no inhiben el estrés oxidativo, esto se evidencia en la figura 20, donde se observa con intensidad del color rojo el efecto perjudicial de la Ang II en las células luego de la incubación con las muestras.

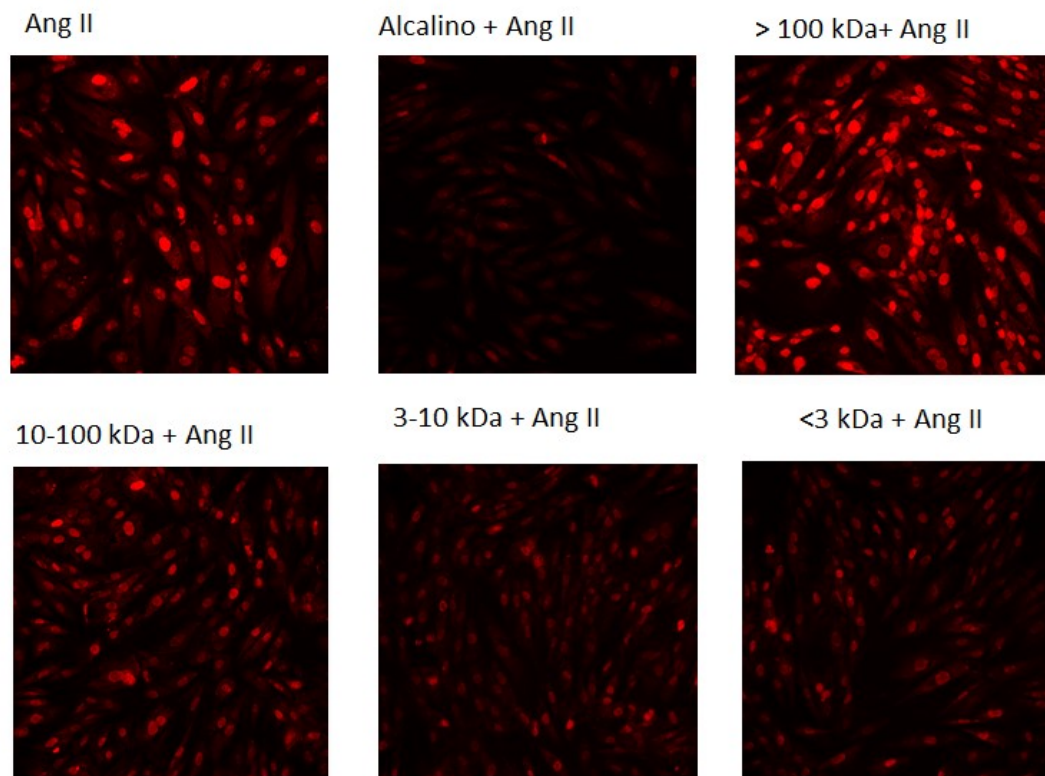


Figura 20. Efecto antioxidante del hidrolizado alcalino y sus fracciones en las células del músculo liso vascular (A7r5).

Las células A7r5 se pretrataron con 50 μM de los hidrolizados durante 1 h antes de 30 min de estimulación con 1 μM de Ang II. Las células se trataron con 10 μM de DHE durante 30 min, luego se visualizaron mediante microscopía fluorescente. Las imágenes fueron tomadas 100x de magnificación.

En la tabla 24 se muestran los resultados de la evaluación del estrés oxidativo en las células A7r5 luego de la incubación con las fracciones del hidrolizado enzimático.

Tabla 24. Medias de las intensidades de fluorescencia luego del estrés oxidativo en las células del músculo liso vascular (A7r5) y acción de las fracciones del hidrolizado enzimático

Muestra	MIF (%)
Control	100.0 ^a
Ang II	148.9 \pm 9.8 ^b
Hidrolizado	100.2 \pm 9.8 ^a
>100 kDa	129.1 \pm 2.2 ^c

10-100 kDa	112 ±2.3 ^d
3-10 kDa	116.8±2.3 ^d
<3 kDa	138.7±1.99 ^e

Las células A7r5 fueron pretratadas con los hidrolizados enzimático y sus fracciones en una concentración de proteína de 2mg/mL durante 1h, luego fueron tratadas con AngII 1μM por 1 hora. El control corresponde a las células no tratadas con los hidrolizados. Los datos son expresados como media ± DS de tres experimentos independientes. Las letras indican diferencias estadísticas significativas (valor p<0.05) en las muestras de cada hidrolizado.

Como se muestra en la tabla 24, las medias de intensidad de fluorescencia no presentan cambios significativos ($p < 0.05$) entre las fracciones 10-100 kDa y 3-10 kDa y se obtiene una disminución del 24 y 21% respecto al control (Ang II) respectivamente. El hidrolizado también suprime el estrés inducido por Ang II. Este resultado también se puede evidenciar en la figura 21, donde se observa que las imágenes del hidrolizado y las fracciones 10-100 kDa y 3-10 kDa tienen menor intensidad indicando que hay menor daño para la célula.

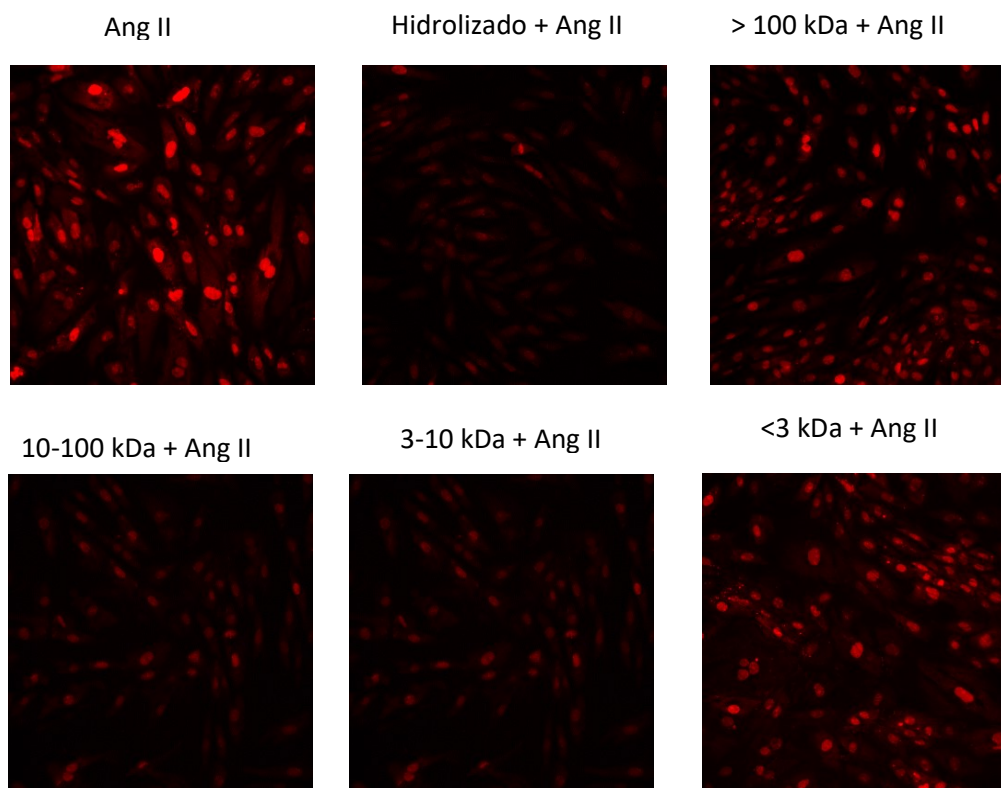


Figura 21. Efecto antioxidante del hidrolizado enzimático y sus fracciones en las células del músculo liso vascular (A7r5).

Las células A7r5 se pretrataron con 50 μM de los hidrolizados durante 1 h antes de 30 min de estimulación con 1 μM de Ang II. Las células se trataron con 10 μM de DHE durante 30 min, luego se visualizaron mediante microscopía fluorescente. Las imágenes fueron tomadas 100x de magnificación.

Teniendo en cuenta la posterior purificación del péptido y las aplicaciones futuras, se seleccionó la fracción (3-10 kDa) proveniente del hidrolizado enzimático para el siguiente fraccionamiento usando RP-HPLC.

4.9 Separación por HPLC de la fracción con mayor actividad antioxidante *in vitro* en células A7r5

La fracción 3-10kDa del hidrolizado enzimático fue separada por medio RP-HPLC en nueve fracciones entre 10 y 28 min con un gradiente de acetonitrilo 15-20%. En la figura 22 se puede observar el cromatograma leído a 215nm. Dado que la separación por RP-HPLC se basa en polaridad se espera que los péptidos grandes polares o hidrofílicos eluyen primero que los péptidos no polares o hidrófobos (Shazly et al., 2017).

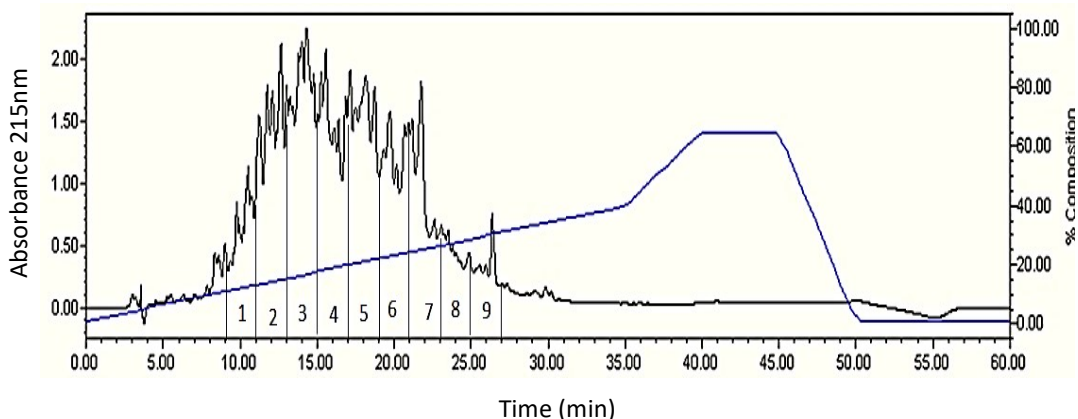


Figura 22. Cromatograma RP-HPLC de la separación de la fracción 3-10kDa del hidrolizado enzimático en una columna C-bridge X18 (10 x 150 mm, 5 μm). La fase móvil A fue (0.1% TFA en agua Milli-Q) y el tampón B (0.1% TFA en ACN), la absorbancia fue medida a 215 nm.

Las nueve fracciones fueron liofilizadas y luego se determinó la actividad antioxidante en la línea celular A7r5 luego de la inducción del estrés oxidativo con Ang II. En la tabla 25 se muestra las medias de las intensidades de fluorescencia.

Tabla 25. Medias de las intensidades de fluorescencia luego del estrés oxidativo en las células del músculo liso vascular (A7r5) y acción de las fracciones por HPLC obtenidas de fracción 3-10 kDa del hidrolizado enzimático.

Muestra	MIF(%)
Control	100.0 ^a
Ang II	134.6±9.9 ^b
F1	124.4±4.8 ^c
F2	110.7±9.5 ^d
F3	113.5±7.3 ^d
F4	117.5±9.6 ^{dc}
F5	132.0±9.0 ^{ec}
F6	157.2±7.0 ^f
F7	147.0±9.0 ^g
F8	181.3±7.5 ^h
F9	182.6±9.7 ^h

Las células A7r5 fueron pretratadas con las fracciones provenientes de la separación por RP-HPLC de la fracción 3-10 kDa del hidrolizado enzimático en una concentración de proteína de 2mg/mL durante 1h, luego fueron tratadas con AngII 1µM por 1 hora. El control corresponde a las células no tratadas con los hidrolizados.

Los datos son expresados como media ± DS de tres experimentos independientes. Las letras indican diferencias estadísticas significativas (valor $p < 0.05$) entre las fracciones.

Las fracciones F2 y F3 mostraron más actividad antioxidante debido a la reducción de la producción de superóxido (Figura 23). Estudios similares informaron los péptidos que son purificados usando la cromatografía por fase reversa y son eluidos en los primeros 25 minutos son aquellos que son solubles a concentraciones de acetonitrilo menores al 50% siendo por lo tanto más solubles en agua (Forghani et al., 2016; Hanafi et al., 2018). Cabe resaltar que la fracción 3-10 kDa presentó mejor actividad que sus fracciones obtenidas por fase reversa, lo cual puede tener dos explicaciones, la primera es que el fraccionamiento del hidrolizado por polaridad no es efectivo y requiere otras técnicas de separación como otros autores que emplean cromatografía de intercambio iónico (Ahn et al., 2014; X. Wu et al., 2015) y la segunda es que durante la cromatografía de fase reversa RP-HPLC se incrementan los radicales superóxido, tal como lo muestra Girgih et al., (2015).

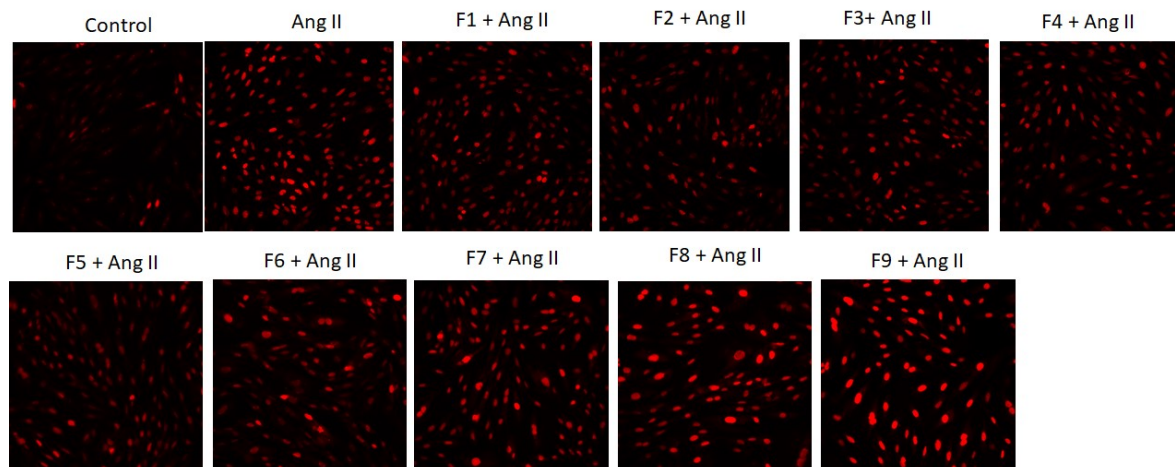


Figura 23. Efecto antioxidante de las fracciones provenientes de la serparación por RP-HPLC de la fracción 3-10kDa proveniente del hidrolizado enzimático de escamas de tilapia roja en las células del músculo liso vascular (A7r5).

Las células A7r5 se pretrataron con 50 μ M de los hidrolizados durante 1 h antes de 30 min de estimulación con 1 μ M de Ang II. Las células se trataron con 10 μ M de DHE durante 30 min, luego se visualizaron mediante microscopía fluorescente. Las imágenes fueron tomadas 100x de magnificación.

Otros autores han identificado péptidos con alta actividad antioxidante celular a través de la neutralización de ROS intracelulares a partir de subproductos piscícolas tales como músculo de la tilapia (Yarnpakdee et al., 2015), la gelatina de escamas de tilapia (Ngo et al., 2010) y vísceras de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) (Gómez et al., 2019)

4.10 Secuenciación del pico con mayor actividad antioxidante

Las fracciones F2 y F3 se sometieron a LC-MS / MS para la identificación de péptidos. Según el fraccionamiento de peso molecular, las fracciones estaban entre 3-10kDa, sin embargo, los espectros de masas muestran que hay péptidos con menor peso alrededor de <3kDa. Este resultado podría explicarse por acumulación de material en la membrana presente en el sistema de ultrafiltración, donde pueden quedar atrapados péptidos de diferentes tamaños.

Las secuencias de péptidos identificadas se enumeraron en las Tabla 26, y el espectro representativo respectivo de péptido de novo MS / MS de los picos 2 y 3 (Figura 24)

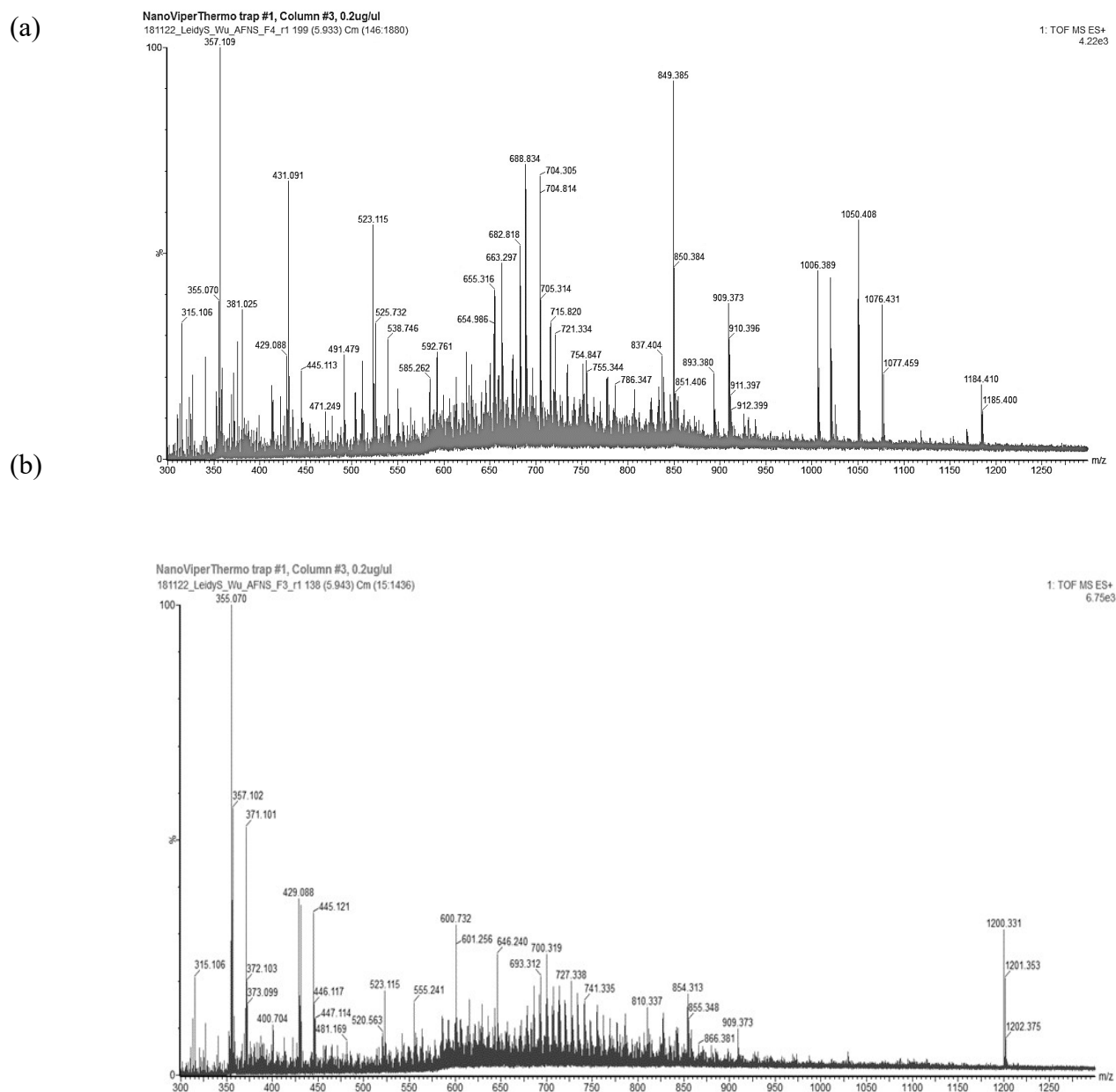


Figura 24. Espectro LC-MS/MS de F2 (a) y F3 (b) de la fracción 3-10kDa del hidrolizado enzimático de escamas de tilapia roja preparado con Alcalasa® 2.4L.

Tabla 26. Secuencia de péptidos de F2 y F3

F	No.	m/z	Secuencia de péptidos
2	1	806.4	Pro-Gln-Gly-Pro-Ile-Gly-Val-Pro
	2	854.3	Gln-Gly-Leu-Gln-Gly-Leu-Pro-Gly-Thr

3	600.7	Gly-Thr-Pro-Gly-Leu-Gln-Gly-Met-Pro-Gly-Glu-Arg	
4	909.4	Ala-Pro-Gly-Pro-Ala-Gly-Ala-Arg-Gly-Asn	
3	1	849.4	Gln-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Ala
2	503.7	Gly-Pro-Ser-Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Lys-Gly-Asn	
3	1050.4	Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Thr-Gly-Ala-Arg-Gly-Ala-Pro	
4	525.7	Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Thr-Gly-Ala-Arg-Gly-Ala-Pro	
5	662.8	Gln-Glu-Thr-Thr-Gly-Val-Glu-Gly-Pro-Lys-Gly-Asp-Thr	
6	688.8	Gly-Pro-Arg-Gly-Leu-Pro-Gly-Glu-Arg-Gly-Arg-Pro-Gly-Ala	
7	696.3	Gly-Pro-Ala-Gly-Ser-Pro-Gly-Phe-Gln-Gly-Leu-Pro-Gly-Pro-Ala-Gly	
8	435.7	Ser-Arg-Gly-Leu-Pro-Gly-Met-Glu	
9	910.4	Lys-Gly-Pro-Pro-Gly-Glu-Ile-Gly-Arg	
10	701.2	Ser-Asp-Gly-Phe-Gln-Phe	
11	721.3	Pro-Ala-Gly-Leu-Pro-Gly-Pro-Ala	
12	1020.4	Gly-Ala-Pro-Gly-Pro-Ala-Gly-Gln-Val-Gly-Ala-Pro	
13	1076.4	Gly-Ser-Pro-Gly-Ala-Asp-Gly-Pro-Ile-Gly-Ala-Pro-Gly	
14	538.7	Gly-Ser-Pro-Gly-Ala-Asp-Gly-Pro-Ile-Gly-Ala-Pro-Gly	
15	704.3	Pro-Gly-Ala-Glu-Gly-Ala-Pro-Gly-Arg-Asp-Gly-Ala-Ala-Gly-Pro-Lys	
16	715.8	Pro-Gly-Glu-Lys-Gly-Ser-Pro-Gly-Ala-Asp-Gly-Pro-Ile-Gly-Ala-Pro	

Todos los péptidos de los picos 2 y 3 son hidrolizados de colágeno alfa 1, el cual es uno de los tipos de colágeno más importante y que ha sido reportado por otros autores con actividad antioxidante a partir de hidrólisis enzimática (Chen et al., 2018). Algunas de las secuencias tienen un patrón de aminoácidos (Gly-XY)_n, esto se encuentra normalmente en dominios de triple hélice de todos los colágenos no fibrilares, donde X es prolina e Y hidroxiprolina (Röber et al., 2019, Sun et al., 2015,).

También se han reportado péptidos con alta actividad antioxidante celular de otras porciones de tilapia, como músculo (Yarnpakdee et al., 2015) y vísceras (Gómez et al., 2019). Se han identificado péptidos de tamaño similar a partir de otros subproductos de pescado. Por ejemplo, Chen et al., (2018) informaron péptidos inhibidores de la ECA entre 815.4 y 2429.2 Da de gelatina de escala de pez lagarto (*Synodus macrops*). Qiu et al., (2019) identificaron tres péptidos

antioxidantes con un peso molecular de 608.57, 609.61 y 804.92 Da a partir del hidrolizado de gelatina de escamas de atún listado (*Katsuwonus pelamis*). Zhang et al., (2019) aislaron seis péptidos antioxidantes con un peso molecular entre 375 y 861 Da. Las secuencias de péptidos identificadas se enumeran en la Tabla 1, y los respectivos espectros de péptidos representativos de F2 y F3 se muestran en la Figura 4.

La actividad antioxidante está determinada por la composición de aminoácidos y la secuencia de péptidos (Abdelhedi & Nasri, 2019); estos péptidos se componen generalmente de 2 a 12 aminoácidos. La presencia de aminoácidos hidrófobos como histidina, fenilalanina, triptófano y tirosina se correlaciona con su actividad biológica (Moayedí et al., 2017). Los aminoácidos como Gly y Pro tienen un efecto importante sobre la actividad antioxidante porque pueden acceder fácilmente a los objetivos hidrofóbicos, por lo que estos péptidos podrían interactuar con los radicales libres y así convertirlos en productos más estables (Abdelhedi & Nasri, 2019). La secuencia de péptidos y su actividad biológica están muy determinadas por las condiciones de hidrólisis y la enzima utilizada. Alcalase® 2.4 L es una de las enzimas más utilizadas para generar péptidos con una alta proporción de residuos de aminoácidos hidrófobos y aromáticos, que generalmente se asocian con altas actividades antioxidantes (Girgih et al., 2015; Silveira Coelho et al., 2019). Las secuencias identificadas de las fracciones 2 y 3 estaban constituidas por 14 aminoácidos diferentes, con abundancia en orden descendente: Gly> Pro> Gln> Ala> Arg> Glu> Thr> Ser> Lys> Phe> Ile> Asn> Met> Val . Entre ellos, Gly y Pro son el principal aminoácido de composición del colágeno tipo I, el colágeno más abundante en animales, del que se derivan muchos péptidos antioxidantes con gran actividad antioxidante (Chen et al., 2018). Además, la presencia de aminoácidos alifáticos hidrófobos como Gly, Ala, Val, Leu, Ile y Met también potenciaron la actividad antioxidante ya que son capaces de neutralizar los radicales libres; también se informa que los aminoácidos ácidos, como Asp y Glu, contribuyen a la actividad antioxidante de los péptidos (Paiva et al., 2017; Udenigwe & Aluko, 2011).

CONCLUSIONES

5 CONCLUSIONES

- Las escamas de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) son una fuente rica de aminoácidos como la glicina, prolina, hidroxiprolina y ácido glutámico, lo cual hace que sea un subproducto con potencial de aprovechamiento en la industria alimentaria y farmacéutica.
- Los esqueletos de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) al ser un subproducto con mayor porcentaje de grasa, requiere más procesos para la extracción e hidrólisis de la proteína en comparación con las escamas.
- La concentración de proteína soluble obtenida durante la hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja se vio afectada por las variables temperatura, concentración de NaOH y escamas, además de las interacciones entre la temperatura y la concentración de NaOH y la interacción entre la concentración de NaOH y la concentración de escamas.
- La hidrolisis enzimática de escamas de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) se vio afectada por las variables tipo de enzima, pH, temperatura, concentración de sustrato y concentración de enzima. Siendo la alcalasa una enzima más eficiente en dicho proceso.
- El cambio de escala de 0.5 L a 7.5 L no afecta significativamente las características de los hidrolizados enzimáticos obtenidos.
- La presencia de sal afecta la medición de la actividad antioxidante en los hidrolizados alcalinos de escamas de tilapia roja.
- La separación de los hidrolizados usando las membranas de ultrafiltración es eficiente para obtener fracciones ricas en péptidos antioxidantes provenientes de escamas de tilapia roja (*Oreochromis spp.*)

- Los péptidos provenientes de hidrolizados enzimáticos de escamas de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) tienen la capacidad de reducir la producción de ROS en células A7r5 de músculo vascular liso.

RECOMENDACIONES

6 RECOMENDACIONES

- Hacer un estudio de los mecanismos de inhibición por sustrato o producto en la hidrólisis enzimática de escamas de tilapia roja con Alcalase® 2.4 L.
- Estudiar el proceso de secado y estabilidad de los hidrolizados de escamas de tilapia roja para ser incorporados en productos de la industria alimenticia y farmacéutica.
- Estudiar el proceso de hidrólisis enzimática en continuo conectado a un sistema de membranas de filtración tangencial y estudiar los fenómenos de ensuciamiento de membranas.
- Sintetizar los péptidos bioactivos secuenciados con mayor actividad antioxidante y evaluar su actividad biológica *in vitro* y en líneas celulares.
- Estudiar el efecto de los hidrolizados y sus fracciones en otras líneas celulares.
- Usar herramientas bioinformáticas para estudiar la relación estructura-actividad de los péptidos obtenidos.
- Dado que se encontraron péptidos con actividad antioxidante *in vivo*, se hace necesario el estudio de estos en animales.
- Estudiar la actividad antioxidante por medio del análisis de biomarcadores como: glutatión, glutatión Px, superóxido dismutasa, catalasa, TBARS, entre otros.
- Para poder llevar a los consumidores estos hidrolizados con actividad antioxidante es importante evaluar la biodisponibilidad y biofuncionalidad de estos por medio del proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*.

- Estudiar las propiedades tecnofuncionales de los hidrolizados obtenidos para su posterior uso en la industria alimenticia.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

7 DIFUSION DE RESULTADOS

Publicaciones en revistas científicas

- Sierra-Lopera, L. M., & Zapata-Montoya, J. E. (2021). Optimization of enzymatic hydrolysis of red tilapia scales (*Oreochromis sp.*) to obtain bioactive peptides. *Biotechnology Reports*, e00611.
- Sierra, L. Fan, H, Zapata, J, Wu, J. (2021). Antioxidant peptides derived from hydrolysates of red tilapia (*Oreochromis sp.*) scale. *LWT-Food Science and Technology* (aceptado)
- Sierra, L.M., & Zapata, J.E. (2018). Effects of operation conditions on antioxidant and iron chelating activity of chemical hydrolysates from red tilapia (*Oreochromis spp .*) Scales. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 15, 210-21
- Sierra Lopera, L. M., Sepúlveda Rincón, C. T., Vásquez Mazo, P., Figueroa Moreno, O. A., & Zapata Montoya, J. E. (2018). Byproducts of aquaculture processes: development and prospective uses. Review. *Vitae*, 25(3), 128-140.

Comunicaciones a congresos

- Comparison between two enzymes in the hydrolysis of red tilapia scales (*Oreochromis sp.*). Modalidad oral, 2018. 2nd International Congress on Advances in Food Chemistry and Technology, Toronto-Canadá
- Optimización de hidrólisis alcalina de escamas de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) para la obtención de hidrolizados con actividad biológica. Modalidad poster, 2017. XI Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos- CIBIA, Valparaíso- Chile.

- Effects of operation conditions on antioxidant and iron chelating activity of chemical hydrolysates from red tilapia (*Oreochromis sp.*) scales. Modalidad poster, 2017. V Simposio Internacional Agroalimentario. Universidad del Atlántico, Barranquilla-Colombia

REFERENCIAS

8 REFERENCIAS

- Abdelhedi, O., & Nasri, M. (2019). Basic and recent advances in marine antihypertensive peptides: Production, structure-activity relationship and bioavailability. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 88, pp. 543–557). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.002>
- Abdollahi, M., & Undeland, I. (2019). Physicochemical and gel-forming properties of protein isolated from salmon, cod and herring by-products using the pH-shift method. *LWT*, *101*, 678–684. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.087>
- Abramovič, H., Grobin, B., Ulrih, N. P., & Cigić, B. (2017). The methodology applied in DPPH, ABTS and folin-ciocalteau assays has a large influence on the determined antioxidant potential. *Acta Chimica Slovenica*, *64*(2), 491–499. <https://doi.org/10.17344/acsi.2017.3408>
- Acquah, C., Chan, Y. W., Pan, S., Agyei, D., & Udenigwe, C. C. (2019). Structure-informed separation of bioactive peptides. *Journal of Food Biochemistry*, *43*(1), e12765. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12765>
- 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*. 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>
- Ahmad Fara, A. N. K., & Abdullah, H. Z. (2016). Influence of calcination temperature on the microstructure and crystallographic properties of hydroxyapatite from black tilapia fish scale. *Materials Science Forum*, *840*, 151–155. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.840.151>
- Ahn, C., Kim, J., & Je, J. (2014). Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, *147*, 78–83.

- Ali, A., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2017). Molecular characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the scales of golden carp (*Probarbus jullieni*). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 450. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-09-1316>
- Ambigaipalan, P., & Al-khalifa, A. S. (2015). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods*, 18, 1125–1137. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.021>
- Anal, A. K., Noomhorm, A., & Vongsawasdi, P. (2013). Protein hydrolysates and bioactive peptides from seafood and crustacean waste: Their extraction, bioactive properties and industrial perspectives. *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*, 709–735. <https://doi.org/10.1002/9781118375082.ch36>
- Aspevik, T., Egede-Nissen, H., & Oterhals, Å. (2016). A systematic approach to the comparison of cost efficiency of endopeptidases for the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by-products. *Food Technology and Biotechnology*, 54(4), 421–431. <https://doi.org/10.17113/ftb.54.04.16.4553>
- Bansil, R., & Turner, B. S. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11(2–3), 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.001>
- Beaubier, S., Framboisier, X., Ioannou, I., Galet, O., & Kapel, R. (2019). Simultaneous quantification of the degree of hydrolysis, protein conversion rate and mean molar weight of peptides released in the course of enzymatic proteolysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1105(December 2018), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.12.005>
- Bechaux, J., Gatellier, P., Le Page, J. F., Drillet, Y., & Sante-Lhoutellier, V. (2019). A comprehensive review of bioactive peptides obtained from animal byproducts and their applications. *Food and Function*, 10(10), 6244–6266. <https://doi.org/10.1039/c9fo01546a>
- Bechtel, P. J., Watson, M. A., Lea, J. M., Bett-Garber, K. L., & Bland, J. M. (2019). Properties of bone from Catfish heads and frames. *Food Science and Nutrition*, 7(4), 1396–1405. <https://doi.org/10.1002/fsn3.974>
- Benjakul, S., Sae-leaw, T., & Simpson, B. K. (2019). Byproducts from Fish Harvesting and Processing. *Byproducts from Agriculture and Fisheries*, 179–217.

<https://doi.org/10.1002/9781119383956.ch9>

- Benjakul, S., Yarnpakdee, S., Senphan, T., Halldorsdottir, S. M., & Kristinsson, H. G. (2014). *Fish protein hydrolysates : production , bioactivities , and applications*.
- Blanco, M., Vázquez, J. A., Pérez-Martín, R. I., & Sotelo, C. G. (2017). Hydrolysates of fish skin collagen: An opportunity for valorizing fish industry byproducts. *Marine Drugs*, 15(5), 131.
- Bocek, A. (2015). Introducción al cultivo de la tilapia. International center for aquaculture and aquatic environments Auburn University. <https://cals.arizona.edu/azaqua/AquacultureTIES/publications/Spanish%20WHAP/TIL1%20Intro%20Tilapia.pdf>
- Borges-Contreras, B., Martínez-Sánchez, C. E., Herman-Lara, E., Rodríguez-Miranda, J., Hernández-Santos, B., Juárez-Barrientos, J. M., ... & Torruco-Uco, J. G. (2019). Angiotensin-converting enzyme inhibition in vitro by protein hydrolysates and peptide fractions from Mojarra of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) skeleton. *Journal of medicinal food*, 22(3), 286-293. <https://doi.org/10.1089/jmf.2018.0163>
- Butré, C. I., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2012). Effects of ionic strength on the enzymatic hydrolysis of diluted and concentrated whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(22), 5644–5651.
- Caliceti, C., Rizzo, P., Ferrari, R., Fortini, F., Aquila, G., Leoncini, E., Zambonin, L., Rizzo, B., Calabria, D., Simoni, P., Mirasoli, M., Guardigli, M., Hrelia, S., Roda, A., & Cicero, A. F. G. (2017). Novel role of the nutraceutical bioactive compound berberine in lectin-like OxLDL receptor 1-mediated endothelial dysfunction in comparison to lovastatin. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 27(6), 552–563. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2017.04.002>
- Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Piovesana, S., Samperi, R., & Laganà, A. (2016). Recent trends in the analysis of bioactive peptides in milk and dairy products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(11), 2677–2685. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9303-8>
- Chabeaud, a., Vandanjon, L., Bourseau, P., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., & Guerard, F. (2009). Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: Application to the refining of bioactive peptidic fractions. *Separation and Purification Technology*, 66(3), 463–471. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.02.012>

- Chakrabarti, S., Liao, W., Davidge, S. T., & Wu, J. (2017). Milk-derived tripeptides IPP (Ile-Pro-Pro) and VPP (Val-Pro-Pro) differentially modulate angiotensin II effects on vascular smooth muscle cells. *Journal of Functional Foods*, *30*, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.12.022>
- Chalamaiah, M., Dinesh, 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>
- Chang, S. K. C., & Zhang, Y. (2017). Protein analysis. *Food analysis* (pp. 315–331). Springer.
- Charoenphun, N., Cheirsilp, B., Sirinupong, N., & Youravong, W. (2013). Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. *European Food Research and Technology*, *236*(1), 57–63. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1860-2>
- Chel-Guerrero, L., Cua-Aguayo, D., Betancur-Ancona, D., Chuc-Koyoc, A., Aranda-González, I., & Gallegos-Tintoré, S. (2020). Antioxidant and chelating activities from Lion fish (*Pterois volitans* L.) muscle protein hydrolysates produced by in vitro digestion using pepsin and pancreatin. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *32*(1), 62. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2020.v32.i1.2060>
- Chen, D., Mu, X., Huang, H., Nie, R., Liu, Z., & Zeng, M. (2014). Isolation of a calcium-binding peptide from tilapia scale protein hydrolysate and its calcium bioavailability in rats. *Journal of Functional Foods*, *6*(1), 575–584. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.001>
- Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R., & Hong, B. (2016). Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT - Food Science and Technology*, *66*, 453–459. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.070>
- Chen, J., Liu, Y., Wang, G., Sun, S., Liu, R., Hong, B., Gao, R., & Bai, K. (2018). Processing optimization and characterization of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from lizardfish (*Synodus macrops*) scale gelatin. *Marine Drugs*, *16*(7), 228. <https://doi.org/10.3390/md16070228>
- Chen, Q., Wang, Q., Zhu, J., Xiao, Q., & Zhang, L. (2018). Reactive oxygen species: key regulators in vascular health and diseases. *British Journal of Pharmacology*, *175*(8), 1279–1292. <https://doi.org/10.1111/bph.13828>
- Chen, X., Tume, R. K., Xu, X., & Zhou, G. (2017). Solubilization of myofibrillar proteins in

- water or low ionic strength media: Classical techniques, basic principles, and novel functionalities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(15), 3260–3280. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1110111>
- Cheung, I. W. Y., Cheung, L. K. Y., Tan, N. Y., & Li-Chan, E. C. Y. (2012). The role of molecular size in antioxidant activity of peptide fractions from Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates. *Food Chemistry*, 134(3), 1297–1306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.215>
- Chomnawang, C., & Yongsawatdigul, J. (2013). Recovery of Tilapia Frame By- Products by pH-Shift Method. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 22, 112–119. <https://doi.org/10.1080/10498850.2011.629077>
- Choonpicharn, S., Jaturasitha, S., Rakariyatham, N., Suree, N., & Niamsup, H. (2014). Antioxidant and antihypertensive activity of gelatin hydrolysate from Nile tilapia skin. *Journal of food science and technology*, 52(5), 3134-3139. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1581-6>
- Chow, C. J., & Yang, J. I. (2011). The effect of process variables for production of cobia (*Rachycentron canadum*) skin gelatin hydrolysates with antioxidant properties. *Journal of Food Biochemistry*, 35(3), 715–734. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00412.x>
- Chuaychan, S., & Benjakul, S. (2016). Effect of maltodextrin on characteristics and antioxidative activity of spray-dried powder of gelatin and gelatin hydrolysate from scales of spotted golden goatfish. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3583–3592. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2340-7>
- Chuaychan, S., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2017). Characteristics and gelling property of gelatin from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5), e13139.
- 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>
- Cigić, I. K., Vodošek, T. V., Košmerl, T., & Strlič, M. (2008). Amino Acid quantification in the presence of sugars using HPLC and pre-column derivatization with 3-MPA/OPA and FMOC-Cl. *Acta Chimica Slovenica*, 55(3).
- Copeland, R. a, & Wiley, a J. (2000). Enzymes: A practical introduction. In *The*

- Communications of the TeX Users Group*, 7, (2). <https://doi.org/10.1021/jm020467f>
- Corbatón-Báguena, M. J., Álvarez-Blanco, S., & Vincent-Vela, M. C. (2018). Evaluation of fouling resistances during the ultrafiltration of whey model solutions. *Journal of Cleaner Production*, 172, 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.149>
- Cupp-Enyard, C., & Aldrich, S. (2008). Sigma's non-specific protease activity assay-casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiments*, 19, 2–4. <https://doi.org/10.3791/899>
- Da Silva, C. M. L., Spinelli, E., & Rodrigues, S. V. (2015). Fast and sensitive collagen quantification by alkaline hydrolysis/hydroxyproline assay. *Food Chemistry*, 173, 619–623. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.073>
- DANE. (2014). Fuente de proteína animal de excelente calidad. *Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE)*, 1–64.
- De Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2015). A response surface approach on optimization of hydrolysis parameters for the production of egg white protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(1), 55–62.
- De Lucca Camargo, L., & Touyz, R. M. (2019). Reactive Oxygen Species. In *Textbook of Vascular Medicine* (pp. 127–136). Springer.
- De Oliveira, V. S., Augusta, I. M., Braz, M. V. da C., Riger, C. J., Prudêncio, E. R., Sawaya, A. C. H. F., Sampaio, G. R., Torres, E. A. F. da S., & Saldanha, T. (2020). Aroeira fruit (*Schinus terebinthifolius Raddi*) as a natural antioxidant: Chemical constituents, bioactive compounds and in vitro and in vivo antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 315(April 2019). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126274>
- Deng, Y., Butré, C. I., & Wierenga, P. A. (2018). Influence of substrate concentration on the extent of protein enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal*, 86, 39–48.
- Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen, P., & Bergé, J.-P. (2006). Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry*, 41(11), 2327–2332.
- Drummond, L., Álvarez, C., & Mullen, A. M. (2019). Proteins recovery from meat processing coproducts. *Sustainable meat production and processing*, 69-83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814874-7.00004-3>
- Echavarría, N., Atehortúa, N., & Tobón, O. (2016). Manual de producción y consumo sostenible gestión del recurso hídrico. *Cultivo de Trucha y Tilapia Piscícolas Convenio*.

- Ehrlich, H. (2014). Fish scales as mineral-based composites. *Biological Materials of Marine Origin*, 4, 213–236. Springer Publishing. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5730-1_4
- El-Rashidy, A. A., Gad, A., Abu-Hussein, A. E. H. G., Habib, S. I., Badr, N. A., & Hashem, A. A. (2015). Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish scale collagen. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 618–626. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.019>
- Essuman, E. K., Ankar-Brewoo, G. M., Ofosu, I. W., & Barimah, J. (2014). Optimization of protein extraction from fern frond using response surface methodology (RSM). *Ife Journal of Science*, 16(1), 149–159.
- Fan, H., Bhullar, K. S., & Wu, J. (2021). Spent hen muscle protein-derived ras regulating peptides shows antioxidant activity in vascular cells. *Antioxidants*, 10(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/antiox10020290>
- FAO. (2000). El Estado mundial de la pesca y la acuicultura, 2000. Food & Agriculture Org.
- FEDEACUA. (2015). Plan de negocio sectorial de la piscicultura 2015. Colombia Productiva. <https://www.colombiaproductiva.com/ptp-capacita/publicaciones/sectoriales/publicaciones-acuicola/plan-de-negocio-sectorial-de-la-piscicultura-2015>
- Figuroa, O. A., Zapata, J. E., & Sánchez, C. P. (2016). Optimización de la hidrólisis enzimática de proteínas de plasma bovino. *Informacion Tecnologica*, 27(2), 39–52. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000200006>
- Figuroa, O., Zapata, J., & Gutiérrez, G. (2012). Modelamiento de la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas del plasma bovino. *Revista EIA*, 17, 71–84.
- Forghani, B., Zarei, M., Ebrahimpour, A., Philip, R., Bakar, J., Hamid, A. A., & Saari, N. (2016). Purification and characterization of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides derived from *Stichopus horrens*: Stability study against. *Journal of Functional Foods*, 20, 276–290. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.10.025>
- Gajanan, P. G., Elavarasan, K., & Shamasundar, B. A. (2016). Bioactive and functional properties of protein hydrolysates from fish frame processing waste using plant proteases. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(24), 24901–24911. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7618-9>
- García-Moreno, P. J., Batista, I., Pires, C., Bandarra, N. M., Espejo-Carpio, F. J., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2014). Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded

- Mediterranean fish species. *Food Research International*, 65(PC), 469–476. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.061>
- Gauza-Włodarczyk, M., Kubisz, L., & Włodarczyk, D. (2017). Amino acid composition in determination of collagen origin and assessment of physical factors effects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 987–991. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.013>
- Gelves, R., Benavides, A., & Quintero, J. C. (2013). CFD prediction of hydrodynamic behavior in the scale up of a stirred tank reactor for aerobic processes. *Ingeniare Revista Chilena de Ingenieria*, 21, 347–361.
- 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>
- Gil-Duran, S., Arola, D., & Ossa, E. A. (2016). Effect of chemical composition and microstructure on the mechanical behavior of fish scales from *Megalops Atlanticus*. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 56, 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.11.028>
- 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 Chemistry*, 173, 652–659. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.079>
- Gomez-Guillen, M. C., Gimenez, B., Lopez-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813–1827. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
- Gómez, L. J., Figueroa, O. A., & Zapata, J. E. (2013). Actividad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de plasma bovino obtenidos por efecto de Alcalasa® 2.4 L. *Información tecnológica*, 24(1), 33–42. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000100005>
- Gómez, L. J., Gómez, N. A., Zapata, J. E., López-García, G., Cilla, A., & Alegría, A. (2019). In-vitro antioxidant capacity and cytoprotective/cytotoxic effects upon Caco-2 cells of red tilapia (*Oreochromis spp.*) viscera hydrolysates. *Food Research International*, 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 hidrólisis enzimática de vísceras de tilapia roja (*Oreochromis sp.*). *Informacion Tecnologica*, 28(4), 47–56. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000400007>
- Grimaldos, N. A. G., & Zapata, J. E. (2020). Scaling up the enzymatic hydrolysis of bovine plasma protein to produce an antioxidant from a biological source. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 22 (1), 150-158. <https://doi.org/10.2174/1389201021666200807104636>
- Gunasekaran, J., Kannuchamy, N., Kannaiyan, S., Chakraborti, R., & Gudipati, V. (2015). Protein hydrolysates from shrimp (*Metapenaeus dobsoni*) head waste: optimization of extraction conditions by response surface methodology. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 24(5), 429–442. <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.787134>
- 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 and Technology*, 51, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.02.007>
- Hamzeh, A., Rezaei, M., Khodabandeh, S., Motamedzadegan, A., Noruzinia, M., & Regenstein, J. Mac. (2019). Optimization of antioxidant peptides production from the mantle of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) using RSM and fractionation. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 28(4), 392–401. <https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1594480>
- Hanafí, M. A., Hashim, S. N., Chay, S. Y., Ebrahimpour, A., Zarei, M., Muhammad, K., Abdul-Hamid, A., & Saari, N. (2018). High angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of Alcalase-digested green soybean (*Glycine max*) hydrolysates. *Food Research International*, 106, 589–597. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.030>
- Harnedy, P. & FitzGerald, R. (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 6–24. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.09.001>
- 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>
- Hemung, B. O. (2013). Properties of tilapia bone powder and its calcium bioavailability based on transglutaminase assay. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 3(4), 306. <https://doi.org/10.7763/IJBBB.2013.V3.219>

- Henderson, J. W., & Brooks, A. (2010). Improved amino acid methods using agilent zorbax eclipse plus C18 columns for a variety of agilent LC instrumentation and separation goals. *Agilent Technologies*, 1–16.
- Huang, C., Kuo, J., Wu, S., & Tsai, H. (2016). Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis sp.*) by a novel extrusion – hydro-extraction process. *Food Chemistry*, *190*, 997–1006. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.066>
- Huang, C. Y., Wu, C. H., Yang, J. I., Li, Y. H., & Kuo, J. M. (2015). Evaluation of iron-binding activity of collagen peptides prepared from the scales of four cultivated fishes in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, *23*(4), 671–678. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.06.009>
- Ingadottir, B., & Kristinsson, H. G. (2010). Gelation of protein isolates extracted from tilapia light muscle by pH shift processing. *Food Chemistry*, *118*(3), 789–798. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.064>
- Jahandideh, F., Liu, P., & Wu, J. (2018). Purification and identification of adipogenic-differentiating peptides from egg white hydrolysate. *Food Chemistry*, *259*, 25-30 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.099>
- Je, J. Y., Park, S. Y., Hwang, J. Y., & Ahn, C. B. (2015). Amino acid composition and in vitro antioxidant and cytoprotective activity of abalone viscera hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, *16*, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.023>
- Jungbauer, A. (2005). Chromatographic media for bioseparation. *Journal of Chromatography*, *1065*, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.162>
- Karamać, M., Kosińska-Cagnazzo, A., & Kulczyk, A. (2016). Use of different proteases to obtain flaxseed protein hydrolysates with antioxidant activity. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(7). <https://doi.org/10.3390/ijms17071027>
- Kechaou, E. S., Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Jaouen, P., Gouygou, J.-P., Bergé, J.-P., & Amar, R. Ben. (2009). Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *107*(2), 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.10.018>
- Khora, S. S. (2013). Marine fish-derived bioactive peptides and proteins for human therapeutics. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *5*(SUPPL 3), 31–37.

- Khueychai, S., Jangpromma, N., Choowongkomon, K., Joompang, A., Daduang, S., Vesaratchavest, M., Payoungkiattikun, W., Tachibana, S., & Klaynongsruang, S. (2018). A novel ACE inhibitory peptide derived from alkaline hydrolysis of ostrich (*Struthio camelus*) egg white ovalbumin. *Process Biochemistry*, 73, 235–245. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.014>
- 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>
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Hayes, K. D., & Shahidi, F. (2008). Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(6), 1019–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01555.x>
- Kumar, D., Chatli, M. K., Singh, R., Mehta, N., & Kumar, P. (2016). Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. *Dairy Science & Technology*, 96(3), 391–404. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0275-9>
- Kumar, N. S. S., Nazeer, R. A., & Jaiganesh, R. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes , horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). *Amino Acids*, 42, 1641–1649. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0858-6>
- Latimer, G. W. (2012). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Gaithersburg, Md.: AOAC International, ISBN: 978-0-935584-83-7.
- Liang, Q., Chalamaiah, M., Ren, X., Ma, H., & Wu, J. (2018). Identification of new anti-inflammatory peptides from zein hydrolysate after simulated gastrointestinal digestion and transport in Caco-2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(5), 1114–1120. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04562>
- Lin, K., Zhang, L. wei, Han, X., & Cheng, D. you. (2017). Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protease hydrolysates of Qula casein: Quantitative structure-activity relationship modeling and molecular docking study. *Journal of Functional Foods*, 32, 266–277. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.008>
- Lin, Q., Liao, W., Bai, J., Wu, W., & Wu, J. (2017). Soy protein-derived ACE-inhibitory peptide LSW (Leu-Ser-Trp) shows anti-inflammatory activity on vascular smooth muscle cells.

- Journal of Functional Foods*, 34, 248–253. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.04.029>
- Liu, F., Lai, S., Tong, H., Lakey, P. S. J., Shiraiwa, M., Weller, M. G., Pöschl, U., & Kampf, C. J. (2017). Release of free amino acids upon oxidation of peptides and proteins by hydroxyl radicals. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(9), 2411–2420. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0188-y>
- Liu, W., Gu, R., Lin, F., Lu, J., Yi, W., Ma, Y., Dong, Z., & Cai, M. (2013). Isolation and identification of antioxidative peptides from pilot-scale black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) muscle oligopeptides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11), 2782–2788. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6099>
- Liu, X., Zhang, M., Zhang, C., & Liu, C. (2012). Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory, antihypertensive and antihyperlipidaemic activities of protein hydrolysates from *Rhopilema esculentum*. *Food Chemistry*, 134(4), 2134–2140. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.023>
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E. S., Gómez, B., Barba, F. J., Mora, L., Pérez-Santaescolástica, C., & Toldrá, F. (2018). Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. *Trends in Food Science and Technology*, 79, 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.003>
- Maqsoodlou, A., Mahoonak, A. S., Mora, L., Mohebodini, H., Toldrá, F., & Ghorbani, M. (2019). Peptide identification in alcalase hydrolysed pollen and comparison of its bioactivity with royal jelly. *Food Research International*, 116, 905–915. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.027>
- Mat, D. J. L., Cattenoz, T., Souchon, I., Michon, C., & Le Feunteun, S. (2018). Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: In vitro gastric digestions in static and dynamic pH conditions. *Food Chemistry*, 239, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.115>
- Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A. B., & Kishimura, H. (2011). Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*, 129(3), 1179–1186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.099>
- Mc Auley, M. T. (2019). Computer Modelling for Nutritionists. In *Computer Modelling for Nutritionists*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-39994-2>

- Moayedi, A., Mora, L., Aristoy, M. C., Hashemi, M., Safari, M., & Toldrá, F. (2017). ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fragments obtained from tomato processing by-products fermented using *Bacillus subtilis*: effect of amino acid composition and peptides molecular mass distribution. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *181*(1), 48–64. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2198-1>
- Mojica, P., Cuéllar, S., & Medina, C. (2018). Trucha y Tilapia - Aprovechamiento de subproductos | Superintendencia de Industria y Comercio. *Superintendencia de Industria y Comercio*. <https://www.sic.gov.co/trucha-y-tilapia-aprovechamiento-de-subproductos>
- Monsalve-bravo, G. M., Moscoso-vasquez, H. M., & Alvarez, H. (2014). Scale up of batch reactors using phenomenological-based models. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *53*, 9439–9453.
- Montgomery, D. C. (2017). Design and analysis of experiments. New York: John Wiley.
- Morales, J. A., Figueroa, O. A., & Zapata, J. E. (2017). Optimización de hidrólisis enzimática de la fracción globular de sangre bovina por metodología de superficie respuesta y evaluación de sus propiedades antioxidantes. *Informacion Tecnologica*, *28*(2), 75–86. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000200009>
- Mosquera, M., Giménez, B., Mallmann, I., Ferreira, J., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C., & Brandelli, A. (2014). Nanoencapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. *Food Chemistry*, *156*, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.011>
- Najafian, L., & Babji, A. S. (2014). Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, *9*(1), 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.003>
- Nasri, M. (2019). Bioactive peptides from fish collagen byproducts. *Byproducts from Agriculture and Fisheries*, 309–333. <https://doi.org/10.1002/9781119383956.ch13>
- Nasri, R., Ben, I., Bougatef, A., Nedjar-arroume, N., Dhulster, P., Gargouri, J., Karra, M., & 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>
- Nazeer, R. a., Deeptha, R., Jaiganesh, R., Sampathkumar, N. S., & Naqash, S. Y. (2011). Radical scavenging activity of seela (*Sphyraena barracuda*) and Ribbon Fish (*Lepturacanthus*

- savala) backbone protein hydrolysates. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 17(3), 209–216. <https://doi.org/10.1007/s10989-011-9260-1>
- Ngo, D.-H., Qian, Z.-J., Ryu, B., Park, J. W., & Kim, S.-K. (2010). In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Functional Foods*, 2(2), 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.02.001>
- Ngo, D., Vo, T., Ngo, D., Wijesekara, I., & Kim, S. (2012). Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 378–383. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.06.001>
- Nie, R., Liu, Y., & Liu, Z. (2014). The calcium-binding activity of fish scale protein. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 3(1B), 11–15.
- Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642–646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>
- Nimalaratne, C., Bandara, N., & Wu, J. (2015). Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. *Food Chemistry*, 188, 467–472.
- Nolsøe, H., & Undeland, I. (2009). The acid and alkaline solubilization process for the isolation of muscle proteins: state of the art. *Food Bioprocess Technol*, 2, 1–27. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0088-4>
- 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>
- Nurdiyana, H., K, S. M. M., & Fadhilah, S. N. (2008). Optimization of protein extraction from freeze dried fish waste using response surface methodology (RSM). *International Journal of Engineering and Technology*, 5(1), 48–56. <https://doi.org/10.3923/jas.2009.3121.3125>
- Oh, J. Y., Kim, E. A., Lee, H., Kim, H. S., Lee, J. S., & Jeon, Y. J. (2019). Antihypertensive effect of surimi prepared from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) by angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and characterization of ACE inhibitory peptides. *Process Biochemistry*, 80, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.01.016>

- Okuda, M., Ogawa, N., Takeguchi, M., Hashimoto, A., Tagaya, M., Chen, S., Hanagata, N., & Ikoma, T. (2011). Minerals and aligned collagen fibrils in tilapia fish scales: structural analysis using dark-field and energy-filtered transmission electron microscopy and electron tomography. *Microscopy and Microanalysis*, *17*(5), 788–798. <https://doi.org/10.1017/S1431927611011949>
- Olagunju, A. I., Omoba, O. S., Enujiugha, V. N., Alashi, A. M., & Aluko, R. E. (2018). Pigeon pea enzymatic protein hydrolysates and ultrafiltration peptide fractions as potential sources of antioxidant peptides: An in vitro study. *LWT*, *97*, 269–278. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.003>
- 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>
- Paar, M., Schrabmair, W., Maiold, M., Oetl, K., & Reibnegger, G. (2019). Global regression using the explicit solution of Michaelis-Menten kinetics employing Lambert's w function: high robustness of parameter estimates. *ChemistrySelect*, *4*(6), 1903–1908. <https://doi.org/10.1002/slct.201803610>
- Paiva, L., Lima, E., Neto, A. I., & Baptista, J. (2017). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, antioxidant properties, phenolic content and amino acid profiles of fucus spiralis L. Protein hydrolysate fractions. *Marine Drugs*, *15*(10). <https://doi.org/10.3390/md15100311>
- Palmqvist, B., Kadić, A., Hägglund, K., Petersson, A., & Lidén, G. (2016). Scale-up of high-solid enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood: the effects of reactor flow conditions. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *6*(2), 173–180. <https://doi.org/10.1007/s13399-015-0177-3>
- Pateiro, M., Munekata, P. E. S., Domínguez, R., Wang, M., Barba, F. J., Bermúdez, R., & Lorenzo, J. M. (2020). Nutritional profiling and the value of processing by-products from gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Marine Drugs*, *18*(2), 1–18. <https://doi.org/10.3390/md18020101>
- Pérez-Gálvez, R., Almécija, M. C., Espejo, F. J., Guadix, E. M., & Guadix, A. (2011). Bi-objective optimisation of the enzymatic hydrolysis of porcine blood protein. *Biochemical*

- Engineering Journal*, 53(3), 305–310. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.12.004>
- Phongthai, S., Homthawornchoo, W., & Rawdkuen, S. (2017). Preparation, properties and application of rice bran protein: A review. *International Food Research Journal*, 24(1), 25.
- Picot, L., Ravallec, R., Martine, F. P., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., Guérard, F., Chabeaud, A., Legal, Y., Alvarez, O. M., Bergé, J. P., Piot, J. M., Batista, I., Pires, C., Thorkelsson, G., Delannoy, C., Jakobsen, G., Johanssonm, I., & Bourseau, P. (2010). Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(11), 1819–1826. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4020>
- Power, O., Jakeman, P., & Fitzgerald, R. J. (2013). Antioxidative peptides: Enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*, 44(3), 797–820. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1393-9>
- Prieto, C. A., Guadix, E. M., & Guadix, A. (2008). Influence of temperature on protein hydrolysis in a cyclic batch enzyme membrane reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 42(3), 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.06.018>
- 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(8), 3396–3402. <https://doi.org/10.1021/jf9913458>
- Putra, S. N. K. M., Ishak, N. H., & Sarbon, N. M. (2018). Preparation and characterization of physicochemical properties of golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) protein hydrolysate as affected by different proteases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 13, 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.12.002>
- Qilong, R., Huabin, X., Zongbi, B. A. O., Baogen, S. U., Qiwei, Y., Yiwen, 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)
- Qiu, Y. T., Wang, Y. M., Yang, X. R., Zhao, Y. Q., Chi, C. F., & Wang, B. (2019). Gelatin and antioxidant peptides from gelatin hydrolysate of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) scales: Preparation, identification and activity evaluation. *Marine drugs*, 17(10), 565. 565; <https://doi.org/10.3390/md17100565>
- Quintero, J., & Zapata, J. E. (2017). Optimización de la extracción del colágeno soluble en ácido

- de subproductos de tilapia roja (*Oreochromis spp*) mediante un diseño de superficie de respuesta. *Información Tecnológica*, 28(1), 109–120. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000100011>
- Raghavan, S., & Kristinsson, H. G. (2008). Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: A comparative study of five enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1434–1441. <https://doi.org/10.1021/jf0733160>
- Raghavan, S., & Kristinsson, H. G. (2009). ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 117(4), 582–588. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.058>
- Röber, M., Laroque, S., Lopez, S. A., Scheibel, T., & Börner, H. G. (2019). Modulating the collagen triple helix formation by switching: Positioning effects of depsi-defects on the assembly of [Gly-Pro-Pro] 7 collagen mimetic peptides. *European Polymer Journal*, 112, 301–305. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.12.045>
- 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>
- Sabeena Farvin, K. H., Andersen, L. L., Nielsen, H. H., Jacobsen, C., Jakobsen, G., Johansson, I., & Jessen, F. (2014). Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. *Food Chemistry*, 149, 326–334. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.075>
- Sai-Ut, S., Benjakul, S., Sumpavapol, P., & Kishimura, H. (2014). Effect of drying methods on odorous compounds and antioxidative activity of gelatin hydrolysate produced by protease from *B. amyloliquefaciens* H11. *Drying Technology*, 32(13), 1552–1559. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.904338>
- Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M.-P., & Amar, R. Ben. (2014). Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process. *Food Research International*, 65, 329–336. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.023>
- Sanmartín, E., Arboleya, J. C., Villamiel, M., & Moreno, F. J. (2009). Recent advances in the recovery and improvement of functional proteins from fish processing by-products: Use of protein glycation as an alternative method. *Comprehensive Reviews in Food Science and*

- Food Safety*, 8(4), 332–344. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00083>
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism (pp. 1-28). London, UK: IntechOpen.
- Saxena, A., Tripathi, B. P., Kumar, M., & Shahi, V. K. (2009). Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145, 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.07.004>
- Schmidt, M. M., Dornelles, R. C. P., Mello, R. O., Kubota, E. H., Mazutti, M. A., Kempka, A. P., & Demiate, I. M. (2016). Collagen extraction process. *International Food Research Journal*, 23(3), 913–922.
- Shazly, A. B., He, Z., El-Aziz, M. A., Zeng, M., Zhang, S., Qin, F., & Chen, J. (2017). Fractionation and identification of novel antioxidant peptides from buffalo and bovine casein hydrolysates. *Food Chemistry*, 232, 753–762. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.071>
- Shen, X., Zhang, M., Bhandari, B., & Gao, Z. (2019). Novel technologies in utilization of byproducts of animal food processing: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(21), 3420–3430. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1493428>
- Shi, D., He, Z., & Qi, W. (2005). Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin. *Process Biochemistry*, 40(5), 1943–1949. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.009>
- 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, 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.06.010>
- Silveira Coelho, M., de Araujo Aquino, S., Machado Latorres, J., & de las Mercedes Salas-Mellado, M. (2019). In vitro and in vivo antioxidant capacity of chia protein hydrolysates and peptides. *Food Hydrocolloids*, 91, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.01.018>
- Smith, D. M. (2017). Protein separation and characterization procedures. *Food analysis* (pp. 431–453). Springer.
- Sun, X., Chai, Y., Wang, Q., Liu, H., Wang, S., & Xiao, J. (2015). A natural interruption displays higher global stability and local conformational flexibility than a similar Gly

- mutation sequence in collagen mimic peptides. *Biochemistry*, 54(39), 6106–6113. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00747>
- Surasani, V. K. R. (2018). Acid and alkaline solubilization (pH shift) process: a better approach for the utilization of fish processing waste and by-products. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(19), 18345–18363. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2319-1>
- Surasani, V. K. R., Khatkar, S. K., & Singh, S. (2017). Effect of process variables on solubility and recovery yields of proteins from pangas (*Pangasius pangasius*) frames obtained by alkaline solubilization method: Characteristics of isolates. *Food and Bioprocess Processing*, 106, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.09.008>
- Tan, X., Qi, L., Fan, F., Guo, Z., Wang, Z., Song, W., & Du, M. (2018). Analysis of volatile compounds and nutritional properties of enzymatic hydrolysate of protein from cod bone. *Food Chemistry*, 264, 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.034>
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>
- Teshnizi, Z. M., Robatjazi, S. M., & Mosaabadi, J. M. (2020). Optimization of the enzymatic hydrolysis of poultry slaughterhouse wastes using alcalase enzyme for the preparation of protein hydrolysates. *Applied Food Biotechnology*, 7(3), 153–160. <https://doi.org/10.22037/afb.v7i3.28417>
- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2011). Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5), 3148–3161. <https://doi.org/10.3390/ijms12053148>
- 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>
- Vidal, A. R., Ferreira, T. E., Mello, R. D. O., Schmidt, M. M., Kubota, E. H., Demiate, I. M., Zielinski, A. A. F., & Dornelles, R. C. P. (2018). Effects of enzymatic hydrolysis (Flavourzyme®) assisted by ultrasound in the structural and functional properties of

- hydrolyzates from different bovine collagens. *Food Science and Technology*, 38, 103–108. <https://doi.org/10.1590/fst.16717>
- Villamil, O., Vázquez, H., & Solanilla, J. F. (2017). Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. *Food Chemistry*, 224, 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.057>
- Villanueva, M. (2020). Protección sanitaria de las especies acuícolas. *ICA: Instituto Colombiano Agropecuario*. [https://www.ica.gov.co/getdoc/b082c759-18c7-47da-bed60e76b48fe0/acuicolas-\(1\).aspx](https://www.ica.gov.co/getdoc/b082c759-18c7-47da-bed60e76b48fe0/acuicolas-(1).aspx)
- Wang, B., Wang, Y., Chi, C., Luo, H., Deng, S., & Ma, J. (2013). Isolation and characterization of collagen and antioxidant collagen peptides from scales of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Marine Drugs*, 11, 4641–4661. <https://doi.org/10.3390/md11114641>
- Wang, B., Yang, W., McKittrick, J., & Meyers, M. A. (2016). Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*, 76, 229–318. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2015.06.001>
- Wang C., Chang T., Shi L., Yang H., Cui M., Tambalu L. (2014) Seafood Processing By-products: Collagen and Gelatin. *Seafood Processing By-Products*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9590-1_12
- Wang, J., Liao, W., Nimalaratne, C., Chakrabarti, S., & Wu, J. (2018). Purification and characterization of antioxidant peptides from cooked eggs using a dynamic in vitro gastrointestinal model in vascular smooth muscle A7r5 cells. *Npj Science of Food*, 2(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41538-018-0015-7>
- Wang, W. Y., Zhao, Y. Q., Zhao, G. X., Chi, C. F., & Wang, B. (2020). Antioxidant peptides from collagen hydrolysate of redlip croaker (*Pseudosciaena polyactis*) scales: Preparation, characterization, and cytoprotective effects on H₂O₂-damaged HepG2 cells. *Marine Drugs*, 18(3), 1–19. <https://doi.org/10.3390/md18030156>
- Wang, X., Yu, H., Xing, R., & Li, P. (2017). Characterization, Preparation, and Purification of Marine Bioactive Peptides. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9746720>
- Wangtueai, S., & Noomhorm, A. (2009). Optimization and characterization of gelatin from lizardfish (*Saurida spp.*) scales. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 825–834.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.11.014>

- Wangtueai, S., Siebenhandl-Ehn, S., & Haltrich, D. (2016). Optimization of the preparation of gelatin hydrolysates with antioxidative activity from Lizardfish (*Saurida spp.*) scales gelatin. *Chiang Mai J. Sci*, *43*(1), 1122–1133.
- Wu, W., Li, B., Hou, H., Zhang, H., & Zhao, X. (2017). Isolation and identification of calcium-chelating peptides from Pacific cod skin gelatin and their binding properties with calcium. *Food and Function*, *8*(12), 4441–4448. <https://doi.org/10.1039/C7FO01014A>
- Wu, X., Cai, L., Zhang, Y., Mi, H., Cheng, X., & Li, J. (2015). Compositions and antioxidant properties of protein hydrolysates from the skins of four carp species. *International Journal of Food Science & Technology*, *50*(12), 2589–2597. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12927>
- 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. *Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications*, 225-258. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816695-6.00008-8>
- Xia, J., Wang, G., Lin, J., Wang, Y., Chu, J., Zhuang, Y., & Zhang, S. (2015). Advances and Practices of Bioprocess Scale-up. *Bioreactor Engineering Research and Industrial Applications II*, vol 152. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2014_293
- Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Kristinsson, H. G., & Kishimura, H. (2015). Antioxidant and sensory properties of protein hydrolysate derived from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one- and two-step hydrolysis. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(6), 3336–3349. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1394-7>
- Zamora-Sillero, J., Gharsallaoui, A., & Prentice, C. (2018). Peptides from fish by-product protein hydrolysates and its functional properties: an overview. *Marine Biotechnology*, *20*(2), 118–130. <https://doi.org/10.1007/s10126-018-9799-3>
- Zapata, J. E., Moya, M., & Figueroa, O. A. (2019). Hidrólisis enzimática de la proteína de vísceras de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*): efecto del tipo de enzima, temperatura, pH y velocidad de agitación. *Información Tecnológica*, *30*(6), 63–72. <https://doi.org/10.4067/S0718-076420190006000063>
- Zapata Montoya, J. E., Giraldo-Rios, D. E., & Baéz-Suarez, A. J. (2018). Kinetic modeling of the enzymatic hydrolysis of proteins of visceras from red tilapia (*Oreochromis sp.*): Effect of substrate and enzyme concentration. *Vitae*, *25*(1), 17–25.

<https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v25n1a03>

- Zarei, M., Forghani, B., Ebrahimpour, A., & Abdul-hamid, A. (2015). In vitro and in vivo antihypertensive activity of palm kernel cake protein hydrolysates: Sequencing and characterization of potent bioactive peptides. *Industrial Crops and Products*, 76, 112–120.
- Zhang, D., Wu, X., Chen, J., & Lin, K. (2018). The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration. *Bioactive Materials*, 3(1), 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.08.004>
- Zhang, Yiqi, Tu, D., Shen, Q., & Dai, Z. (2019). Fish scale valorization by hydrothermal pretreatment followed by enzymatic hydrolysis for gelatin hydrolysate production. *Molecules*, 24(16), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules24162998>
- Zhang, Yufeng, 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>
- Zhao, Y. Q., Zhang, L., Tao, J., Chi, C. F., & Wang, B. (2019). Eight antihypertensive peptides from the protein hydrolysate of Antarctic krill (*Euphausia superba*): Isolation, identification, and activity evaluation on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Food Research International*, 121, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.03.035>
- Zheng, L., Zhao, M., Xiao, C., Zhao, Q., & Su, G. (2016). Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: Importance of controlling reaction pH and time. *Food Chemistry*, 192, 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.015>
- Zhong, S., Liu, S., Cao, J., Chen, S., Wang, W., & Qin, X. (2016). Fish protein isolates recovered from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by-products using alkaline pH solubilization and precipitation. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(3), 400–413. <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.865282>
- Zou, T. Bin, He, T. P., Li, H. Bin, Tang, H. W., & Xia, E. Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 21(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules21010072>