

## Caracterización fisicoquímica, tecnofuncional y calidad biológica de hidrolizados de vísceras de Tilapia Roja (*Oreochromis spp.*)

Leidy J. Gómez<sup>1\*</sup> y José E. Zapata<sup>2</sup>

(1) Grupo Giepronol, Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería, Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD, Medellín-Colombia (correo-e: leidyj.gomez@unad.edu.co)

(2) Grupo de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia (correo-e: edgar.zapata@udea.edu.co)

\* Autora a quien debe ser dirigida la correspondencia

Recibido Ago. 5, 2021; Aceptado Oct. 4, 2021; Versión final Nov. 24, 2021, Publicado Jun. 2022

### Resumen

Vísceras de tilapia roja (VTR) desengrasadas son hidrolizadas con Alcalasa 2.4L® para evaluar el efecto del grado de hidrólisis (GH) sobre sus propiedades tecnofuncionales, fisicoquímicas y calidad biológica. La composición de aminoácidos es determinada usando HPLC en fase reversa. Los resultados muestran que hidrólisis poco extensivas mejoran la capacidad espumante y la estabilidad de la espuma, alcanzándose los mejores resultados con GH de 4.2% y 8.4% a pH 4 y 10, respectivamente. La composición de aminoácidos totales muestra que las VTR y sus hidrolizados son una fuente de proteínas de alta calidad nutricional y que su balance de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos es adecuado para resaltar las propiedades tecnofuncionales. Los resultados sugieren que las proteínas de VTR poseen alta capacidad emulsificante, pero dicha propiedad se ve disminuida por el proceso de hidrólisis. En conclusión, las proteínas de VTR y sus hidrolizados tienen potencial aplicación en la industria alimentaria por sus propiedades tecnofuncionales, calidad nutricional y microbiológica.

*Palabras clave: propiedades tecnofuncionales; hidrolizados enzimáticos; tilapia roja; Alcalasa 2.4L*

## Physicochemical characterization and techno-functional properties of Red Tilapia (*Oreochromis spp.*) viscera hydrolysates

### Abstract

Defatted red tilapia viscera (VTR) are hydrolyzed with Alcalase 2.4L® to evaluate the effect of the degree of hydrolysis (DH) on VTR's techno-functional, physicochemical, and biological qualitative properties. The results show that limited hydrolysis improves foaming capacity and foam stability, achieving the best results with DH of 4.2% and 8.4% at pH 4 and 10, respectively. Total amino acid composition shows that VTR and their hydrolysates are protein sources with high nutritional quality that have an adequate balance of hydrophobic and hydrophilic amino acids, highlighting their techno-functional properties. The results suggest that VTR proteins possess high emulsifying capacity, but this property is diminished by hydrolysis. In conclusion, VTR proteins and their hydrolysates have promising applications for the food industry due to their techno-functional properties and their nutritional and microbiological quality.

*Keywords: techno-functional properties; enzymatic hydrolysates; red tilapia; Alcalasa 2.4L*

## INTRODUCCIÓN

La hidrólisis enzimática de proteínas es una técnica biotecnológica que ha cobrado gran importancia, dado que constituye una estrategia efectiva para la obtención de hidrolizados y péptidos con propiedades tecnofuncionales y biológicas (García-Arteaga et al., 2020). Los hidrolizados proteicos pueden tener diferentes aplicaciones en la industria, dependiendo de sus características, las cuales son determinadas entre otros factores, por el grado de hidrólisis (GH) (Villamil et al., 2017). Los hidrolizados de proteínas con GH menor de 10% dan como resultado mejores propiedades tecnofuncionales, tales como emulsificación, capacidad de formación de espuma y mayor solubilidad (Calderón-Chiu et al., 2021). Esta modificación en las propiedades tecnofuncionales, se da principalmente dado que la hidrólisis enzimática provoca una disminución del peso molecular, un aumento en el número de grupos ionizables y exposición de grupos hidrofóbicos ocultos en la proteína nativa, lo que puede modificar las interacciones físicas o químicas con el entorno (Tavano, 2013).

Las ventajas de los hidrolizados frente a las proteínas nativas para mejorar las propiedades tecnofuncionales de superficie activa se encuentran en (i) su capacidad para difundirse más rápidamente hacia la interfaz a través de su solubilidad mejorada y a su vez, para adsorberse más rápidamente en la interfaz aire- agua o lípido-agua; (ii) el hecho de que los dominios hidrofóbicos, que inicialmente están agrupados en el interior de las proteínas, ya están disponibles en la solución y no requieren desnaturalización parcial previa para migrar a la interfase aire-agua en las espumas o agua-aceite en las emulsiones; y (iii) presencia de grupos sulfhidrilo en ciertos péptidos que pueden formar enlaces disulfuro capaces de estabilizar la interfaz y de interconectar péptidos covalentemente (Lacou et al., 2016). Por lo tanto, los hidrolizados de proteínas derivadas de alimentos son ingredientes prometedores para la industria farmacéutica y alimentaria.

La pesca y la acuicultura desempeña un papel significativo y creciente en la provisión de alimentos, nutrición y empleo a nivel global, por lo que es de interés el desarrollo sostenible del sector (FAO, 2020). Sin embargo, uno de los mayores problemas de la industria piscicultura lo constituyen los subproductos, dado que representan alrededor del 60% del peso del animal, siendo la mayoría de estos subproductos desaprovechados (Villamil et al., 2017). Así, la búsqueda de alternativas para utilizar y dar valor agregado a dichos subproductos es un tema de interés científico y comercial. En este sentido, la hidrólisis enzimática de proteínas provenientes de subproductos de organismos acuáticos, constituye una estrategia exitosa, dado que se han encontrado hidrolizados con propiedades biológicas (Gómez et al., 2020) y tecnofuncionales (Halim et al., 2016; Villamil et al., 2017).

Uno de los subproductos mayoritarios en la industria piscícola lo constituyen las vísceras, las cuales pueden representar entre el 12-18% del peso del animal y que son a su vez una alta fuente de proteínas (Villamil et al., 2017). En este sentido, dada la importancia económica de la tilapia y los altos volúmenes de vísceras generados como subproductos, en este trabajo se buscó caracterizar las vísceras de tilapia roja (*Oreochromis spp.*) (VTR) y los hidrolizados de VTR (HVTR), así como evaluar la posibilidad de obtener HVTR con propiedades tecnofuncionales mejoradas respecto a las proteínas nativas, para su potencial aplicación en la industria farmacéutica o alimentaria.

## METODOLOGÍA

Las VTR se obtuvieron en cadena de frío de la Piscícola el Gaitero (Antioquia-Colombia), tomando muestras de lotes de producción diferentes. Posteriormente, fueron desengrasadas utilizando el método de calentamiento-congelación reportado por Arias *et al.* en 2017 (90°C por 20 min), el cual demostró tener buena eficiencia de desengrasado y además de inactivar las enzimas endógenas, después de lo cual se almacenaron a -20°C hasta su uso y análisis. Para evaluar cómo varían las características de las VTR con el proceso de hidrólisis, se realizaron análisis de composición centesimal, microbiológica y perfil de aminoácidos a las VTR completas y del HVTR con GH de 4.2% dado que fue el GH que mostro mejorar sustancialmente la actividad espumante a pH 4 y mejorar la estabilidad de las emulsiones formadas a pH 4 y pH 7.

### *Análisis proximal*

Las determinaciones de humedad, cenizas, proteína bruta (N x 6.25) y grasa total, fueron realizadas siguiendo los métodos oficiales de la AOAC de secado en estufa (AOAC 950.46), calcinación (AOAC 942.05), Kjeldahl (AOAC 992.15) y extracción seca (AOAC 960.39), respectivamente (AOAC, 2006).

### *Análisis microbiológico*

Para la determinación de la calidad microbiológica de las muestras, se realizaron los análisis de recuento de coliformes totales y *Escherichia coli*, detección de *Salmonella sp.* y detección de *Vibrio cholerae*, según lo

dispuesto en la NTC 5443 (Icontec, 2015), además del recuento de microorganismos mesófilos y recuento de mohos y levaduras por la NTC 4132 (Icontec, 1997).

#### *Composición de aminoácidos*

La composición de aminoácidos en las muestras fue determinada usando HPLC en fase reversa según la metodología descrita por (Sepúlveda et al., 2020), con algunas modificaciones. Para la cuantificación de aminoácidos totales, las muestras fueron sometidas a una hidrólisis ácida con HCl 6 N a 110°C durante 18 h. Los aminoácidos fueron analizados en un HPLC UltiMate 3000 con detector UV/VIS con arreglo de diodos DAD (Thermo–Dionex, California- EE.UU.), operado con columna analítica de 5 µm (ZORBAX Eclipse AAA-C18, 4.6x150 mm). La corrida se realizó a 40 °C y un flujo de 2.0 mL/min. Previo a los análisis, las muestras fueron derivatizadas usando OPA para aminoácidos primarios y FMOc para aminoácidos secundarios. Los aminoácidos primarios fueron detectados a 338 nm y los secundarios a 262 nm. La recta de calibración se elaboró empleando una mezcla de estándares de aminoácidos entre 0,2 y 0,5 µmol/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis- EE.UU) y se usó norvalina como estándar interno para corregir el valor de la concentración de aminoácidos.

#### *Cuantificación de metales pesados*

Adicionalmente se realizaron análisis de metales pesados, para completar la evaluación de la calidad general de las VTR. Para el desarrollo del método se pesaron 0.5 g de la muestra a los que se le agregó 3 mL de ácido nítrico y 1 mL de ácido clorhídrico. La digestión ácida se realizó en un speedwave microondas (Berghof-Alemania), usando un programa de calentamiento según la norma EPA 3051A numeral 11.3.5 (USEPA, 1998). Luego de la digestión se hicieron lavados con aguas desionizada y se aforó a 10 mL, para finalmente realizar la lectura de los metales mediante un equipo de emisión atómica MP-AES 4100 (Agilent, California- EE.UU.). El arsénico y el mercurio fueron leídos por la técnica de generación de hidruros con borohidruro de sodio en el mismo equipo MP-AES4100.

#### *Cuantificación de proteína por Lowry*

La concentración de proteína soluble fue determinada mediante el método colorimétrico de Lowry (Lowry et al., 1951), y la absorbancia fue leída a 670 nm usando albumina de suero bovina entre 0 y 1 g de proteína/L para la elaboración de la curva patrón.

#### *Hidrólisis Enzimática*

Las vísceras desengrasadas se pusieron en contacto con Alcalasa 2.4 L® grado alimenticio (Novo Nordisk Co., Dinamarca), la cual fue seleccionada, dado que ha demostrado producir hidrolizados con propiedades tecnofuncionales y con menor sabor amargo que otras enzimas (García-Arteaga et al., 2020).

La hidrólisis se llevó a cabo en un reactor de vidrio de 500 mL, bajo las condiciones establecidas en trabajos previos de los autores del presente estudio (Gómez et al., 2020; Gómez & Zapata, 2017), concentraciones de sustrato de 8 g proteína/L, relaciones enzima/sustrato de 0.306 U/g de proteína, pH 10, temperatura de 60°C, velocidad de agitación 960 rpm y concentración de grasa 0.7 g/L. El control de pH y temperatura se hizo con un electrodo combinado de vidrio, conectado a un Titrando 842 (Metrohm, Suiza) operado por un ordenador (software Tiamo 1.2.1). La reacción fue monitoreada por medio del GH empleando el método del pH-estado para su medición, expresado como la relación entre el número de enlaces peptídicos hidrolizados y el número de enlaces peptídicos totales en la proteína nativa por unidad de peso (ht) según la ecuación 1 (Forghani et al., 2012). Para evaluar el efecto del GH sobre las propiedades tecnofuncionales, el proceso se realizó varias veces, deteniendo la reacción cuando se alcanzaban GH de 4.2, 8.4 y 17.1%. Como control (GH de 0%) se utilizaron soluciones de VTR bajo las mismas condiciones de operación descritas, inactivando la enzima inmediatamente se adiciona.

$$GH (\%) = \frac{B N_B}{M_p \alpha h_t} \times 100 \quad (1)$$

$\alpha$  se estima con base en el valor promedio de la constante de equilibrio pK para los grupos  $\alpha$ -amino liberados, calculados en función del pH y la temperatura de reacción de acuerdo a las ecuaciones 2 y 3 respectivamente (Forghani et al., 2012).

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{(1+10^{\text{pH}-\text{pK}})} \quad (2)$$

$$\text{pK} = 7,8 + \frac{(298 - T)}{298 * T} * 2400 \quad (3)$$

Se empleó un  $h_r$  de 8.22 Eqv/Kg el cual fue calculado previamente para las VTR mediante el método OPA (Gómez et al., 2020) y un  $\alpha$  de 0.99.

#### *Evaluación de las propiedades tecnofuncionales*

Para evaluar el efecto del GH sobre las propiedades tecnofuncionales de los hidrolizados, se escogieron los HVTR con GH inferior a 17.1% para aplicar las pruebas que se describen a continuación.

**Capacidad emulsificante:** Los HVTR fueron diluidos hasta una concentración de 2 mg/mL y su pH fue ajustado a 4, 7 y 10 con HCl o NaOH 6M. Las emulsiones fueron preparadas mezclando 30 mL de HVTR con 10 mL de aceite de girasol. Posteriormente la mezcla fue homogeneizada a 18000 rpm durante 60 s usando un homogeneizador de alta velocidad OV5 (Velp, Usmate- Italia). El índice de actividad emulsificante (IAE) y el índice de estabilidad de la emulsión (IEE) fueron medidos por el método turbidimétrico (Jemil et al., 2014), con algunas modificaciones. Inmediatamente después de la formación de la emulsión una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  fue tomada del fondo del recipiente y mezclada con 2 mL de una solución de SDS (0.1%). La absorbancia de la emulsión diluida fue medida a 500 nm. Una segunda alícuota de la emulsión fue tomada después de 10 min siguiendo el mismo procedimiento. IAE y IEE fueron determinados según las ecuaciones (4) y (5).

$$\text{IAE (m}^2/\text{g)} = \left( \frac{2 \times 2,303 \times A \times FD}{\varphi \times C \times L} \right) \times 100 \quad (4)$$

$$\text{IEE (\%)} = 100 - \left( \frac{\text{IAE}_0 - \text{IAE}_{10}}{\text{IAE}_0} \times 100 \right) \quad (5)$$

**Capacidad espumante:** Los HVTR fueron diluidos hasta una concentración de 5 mg/mL y su pH fue ajustado a 4, 7 y 10 con HCl o NaOH 6M. La capacidad espumante (CE) y la estabilidad de la espuma (EE) fueron determinadas siguiendo la metodología descrita por Jemil et al. (2014), con algunas modificaciones. 50 mL de los HVTR fueron homogeneizados dentro de una probeta graduada a 18000 rpm usando un homogeneizador de alta velocidad OV5, para incorporar el aire durante 60 s a 25 °C. Después del batido, el propulsor fue inmediatamente removido y el volumen total fue medido. CE fue expresado como el porcentaje de incremento en el volumen después de la homogenización en el tiempo cero según la ecuación 6 y EE fue determinado por la medida de volumen de espuma después de 10 min y expresado como un porcentaje de la espuma inicial según la ecuación 7.

$$\text{CE (\%)} = \left( \frac{V_0 - V}{V} \right) \times 100 \quad (6)$$

$$\text{EE (\%)} = \left( \frac{V_{10}}{V_0} \right) \times 100 \quad (7)$$

**Capacidad gelificante:** Los HVTR fueron concentradas hasta 30 g/L y su pH fue ajustado a 4, 7 y 10 con HCl o NaOH 6M. Para la formación del gel se siguió la metodología descrita por Estévez et al. (2017), con algunas modificaciones. Las soluciones fueron dispuestas en eppendorf de 2 mL y calentadas en un baño termostático a 90 °C durante 30 min. Una vez terminado el calentamiento, los tubos fueron inmediatamente enfriados en un baño de hielo y almacenados toda la noche a 4 °C. Al día siguiente las muestras fueron equilibradas a temperatura ambiente, pero el análisis de retención de agua no pudo ser realizado debido a que los HVTR no formaron ningún gel.

**Análisis estadístico:** Para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores de las actividades tecnofuncionales y pruebas de caracterización fisicoquímica de los HVTR con diferentes grados de hidrólisis, las mediciones se hicieron por triplicado y se utilizó la prueba de la mínima diferencia significativa con un nivel de significación de 0,05 (95% de confianza), usando el paquete estadístico Statgraphics Centurion Version 18.1.13.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para una mejor presentación y discusión, los resultados encontrados en este estudio se muestran y analizan en varias sub-secciones: (i) hidrólisis enzimática de las VTR; (ii) Propiedades tecnofuncionales de los HVTR; (iii) Caracterización fisicoquímica y microbiológica de las VTR y HVTR; y (iv) Calidad nutricional y perfil de aminoácidos de las VTR y HVTR.

### Hidrolisis enzimática de las VTR

En figura 1 se muestran los valores del GH en función del tiempo, alcanzándose un GH de 18.3% en los 180 min. En la figura se puede notar que la reacción no tiene una tendencia típica de la cinética de hidrólisis, donde hay una disminución substancial de la velocidad de reacción después de los primeros minutos, y una posterior fase estacionaria, como es el caso de hidrólisis de vísceras de *Mustelus* (Abdelhedi et al., 2016) y de sable negro (Batista et al., 2010). La grafica de hidrólisis de VTR por su parte, presenta una primera fase con una pendiente más pronunciada en los primeros 30 min, posteriormente el GH aumenta de una forma casi lineal en función del tiempo en las 3 horas de reacción. Estos resultados sugieren que la hidrólisis de las VTR no se ve afectada por inhibición por productos, inactivación de la enzima o agotamiento de enlaces peptídicos disponibles para la hidrólisis, en las primeras 3 h de reacción, dado que estos son los factores a los que se ha atribuido la rápida disminución en la velocidad de reacción en las curvas típicas de hidrólisis enzimática de proteínas (Abdelhedi et al., 2016).

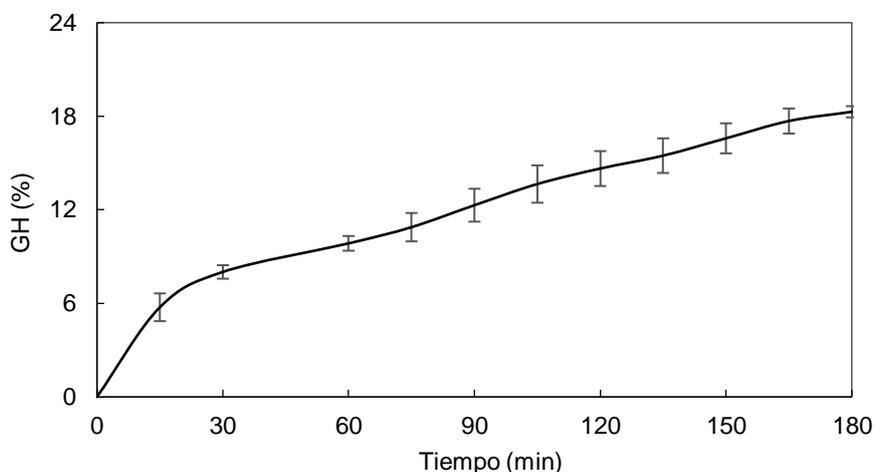


Fig. 1: Curva del GH en función del tiempo para la hidrólisis de VTR con Alcalasa 2.4 L.

### Propiedades tecnofuncionales de los HVTR

Los péptidos formados durante el proceso de hidrólisis han demostrado ser sustancialmente más solubles y adicionalmente pueden mejorar las propiedades emulsificantes, espumante y gelificantes, en comparación con la proteína nativa (Lacou et al., 2016). Sin embargo, la hidrólisis debe ser controlada dado que se ha demostrado que hidrólisis extensas llevan a la pérdida de la calidad anfífila de la proteína, ocasionando la disminución de la funcionalidad (Villamil et al., 2017). Considerando la estrecha relación entre GH y las propiedades tecnofuncionales de los hidrolizados, se evaluó la capacidad espumante, emulsificante y gelificante de los HVTR con GH entre 0 y 17,1% a diferentes condiciones de pH según la metodología descritas anteriormente. Ninguno de los HVTR presentó actividad gelificante, lo que sugiere que las proteínas de VTR no tienen las características estructurales indicadas para lograr la asociación proteína- proteína entre sus cadenas y formar una red capaz de atrapar agua en su interior (Tavano, 2013).

#### Capacidad emulsificante

El índice de actividad emulsificante (IAE) y el índice de estabilidad de la emulsión (IEE), de las VTR y los HVTR a una concentración de 2 mg/mL, bajo diferentes condiciones de pH, son mostrados en la tabla 1. Los resultados indican que el IAE aumenta para todos los GHs conforme aumenta el pH, lo cual puede deberse a que en términos generales el pH ácido lleva a una menor solubilidad de proteínas y péptidos, mientras que aumentos en el pH generan aumentos graduales en la solubilidad (Görgüç et al., 2020) y se ha encontrado una relación directa entre la solubilidad y el IAE (Villamil et al., 2017). En cuanto al efecto del GH sobre el IAE de los HVTR, en la tabla 1 se puede ver que la hidrólisis de las VTR provocó una fuerte disminución de la actividad ( $p < 0.05$ ), principalmente a pH 4 y 7, los cuales disminuyeron 10.1 y 2.8 veces respectivamente, cuando se alcanzó un GH de 17.1%. Dicha disminución en la actividad se debe a que pese a que los péptidos

de bajo peso molecular se difunden y absorben rápidamente (Görgüç et al., 2020), estos tienen menor capacidad para interactuar en la interfaz debido a fuerzas electrostáticas de repulsión, que les impiden desplegarse y reorientarse adecuadamente, llevando a una menor eficiencia en la disminución de la tensión interfacial (Mokni Ghribi et al., 2015). Resultados similares han sido reportados por otros autores, quien han encontrado que el incremento en el GH, provoca una disminución en el IAE para hidrolizados de proteínas de huevos de atún listado (Intarasirisawat et al., 2012), hidrolizados de proteínas aisladas de guisantes (García-Arteaga et al., 2020) e hidrolizados de subproductos (cabeza y esqueleto) de tilapia nilótica (Srikanya et al., 2017). Mientras que otros autores han encontrado resultados contrarios, con un aumento en el IAE de los hidrolizados de piel y vísceras de sepia común (*Sepia officinalis*), con el incremento del GH; principalmente con pH alcalino (Balti et al., 2010).

Tabla 1: Índice de actividad emulsificante (IAE) y de estabilidad emulsificante (IEE), de los HVTR bajo diferentes condiciones de pH y GH (a-d diferentes letras en la misma columna, indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (p < 0,05)

GH (%)	IAE (m <sup>2</sup> /g)			IEE (%)		
	pH 4	pH 7	pH 10	pH 4	pH 7	pH 10
0	102.1 ± 6.6 <sup>a</sup>	111.3 ± 9.7 <sup>a</sup>	127.6 ± 12.6 <sup>a</sup>	69.4 ± 6.0 <sup>a</sup>	73.4 ± 5.6 <sup>a</sup>	96.6 ± 1.0 <sup>a</sup>
4.2	60.3 ± 5.1 <sup>b</sup>	74.5 ± 5.6 <sup>b</sup>	113.8 ± 9.6 <sup>b</sup>	82.4 ± 5.5 <sup>b</sup>	95.9 ± 3.7 <sup>b</sup>	95.2 ± 4.6 <sup>a</sup>
8.4	57.3 ± 5.0 <sup>b</sup>	95.4 ± 6.9 <sup>c</sup>	109.6 ± 8.8 <sup>b</sup>	98.4 ± 9.4 <sup>c</sup>	93.2 ± 4.3 <sup>b</sup>	99.9 ± 8.3 <sup>a</sup>
17.1	10.1 ± 0.5 <sup>c</sup>	39.5 ± 3.1 <sup>d</sup>	110.2 ± 2.8 <sup>b</sup>	93.7 ± 6.3 <sup>bc</sup>	90.5 ± 8.2 <sup>b</sup>	99.8 ± 3.2 <sup>a</sup>

Por otro lado, las muestras presentaron una alta estabilidad de las emulsiones formadas por los HVTR bajo todas las condiciones evaluadas, con un rango entre 69.4 y 99.9% (tabla 1). No se encontraron diferencias significativas en el IEE para los diferentes GHs a pH 10 (p > 0.05), mientras que para los pH 4 y 7, contrario a lo encontrado para el IAE, la hidrólisis aumentó el IEE en un 29.0 y 22.5% respectivamente. Estos resultados están en concordancia con los reportados por Intarasirisawat et al. (2012), quienes encontraron que el índice de estabilidad de la emulsión formada por hidrolizados de proteínas de huevos de atún listado, aumenta con el GH, cuando se trabaja con una concentración de proteína de 5 mg/mL. Este aumento en el IEE por efecto del proceso de hidrólisis se puede atribuir principalmente al aumento de la solubilidad, la flexibilidad molecular de los polipéptidos y la exposición de áreas hidrófobas, que permite la formación de una membrana protectora más cohesiva y viscoelástica que inhibe la coalescencia de la gota de aceite (Mokni Ghribi et al., 2015). De forma similar, en la literatura se ha reportado que hidrolizados enzimáticos de proteína pueden disminuir la capacidad emulsionante pero fomentar emulsiones más estables (García-Arteaga et al., 2020).

Aunque la hidrólisis mostró un efecto negativo sobre la capacidad emulsificante de las VTR, es importante resaltar el alto IAE encontrado para las VTR sin hidrolizar en todos los pHs evaluados, con un rango entre 102,1 y 127,6 m<sup>2</sup>/g, cuyo máximo valor fue alcanzado a pH 10. A la fecha no se encuentran reportes previos de la capacidad emulsificante de VTR, pero los valores acá encontrados fueron superiores respecto al IAE reportado para hidrolizados de piel y vísceras de sepia común, cuyo mayor valor fue de 68.7 m<sup>2</sup>/g (Balti et al., 2010). Por lo anterior se podría pensar que las VTR son un subproducto de la industria piscícola con potencial aplicación como emulsificante dado su alto IAE e IEE.

**Capacidad espumante**

En la figura 2 se muestra la capacidad espumante (CE) y la estabilidad de la espuma (EE) para las VTR y los HVTR con diferentes GHs. Los resultados mostraron las VTR poseen CE previo al proceso de hidrólisis, la cual se ve fuertemente disminuida a pH ácido, lo que limitaría su aplicación en una amplia gama de alimentos, similar a lo que ocurre con muchas proteínas.

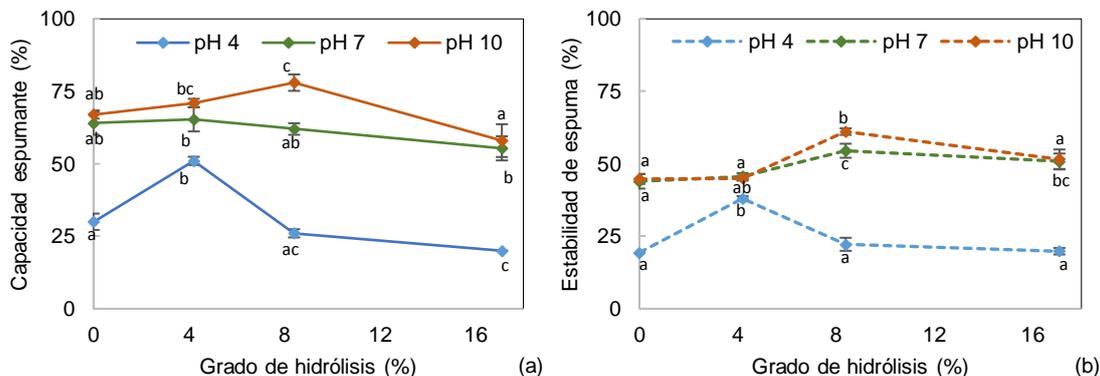


Fig. 2: Efecto del GH sobre (A) capacidad espumante y (B) estabilidad de la espuma, de los HVTR bajo diferentes condiciones de pH. a-c Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (p < 0.05).

Por esta razón la hidrólisis de proteínas se ha convertido en una técnica cada vez más común ya que mejora la funcionalidad de las proteínas en un amplio rango de niveles de pH (Villamil et al., 2017). Hipótesis que fue confirmada, dado que los resultados muestran que la hidrólisis aumenta significativamente la CE de los HVTR a pH 4 y 10 ( $p < 0.05$ ). De esta manera, la mayor capacidad espumante a pH 4 fue alcanzada con el HVTR con GH: 4.2%, el cual presentó una CE 1.7 veces mayor que las VTR sin hidrolizar. Mientras que la mayor actividad a pH 10 fue alcanzada con el HVTR con GH de 8.4% el cual paso de  $67.0 \pm 1.4$  a  $78.0 \pm 2.8$  %. En todos los casos hidrolisis más extensas llevaron a una disminución de la CE.

La formación de espuma se rige por tres factores, incluido el transporte, la penetración y la reorganización de las moléculas en la interfaz aire-agua (Intarasirisawat et al., 2012). Por tanto, el aumento en la capacidad espumante de las proteínas después del proceso de hidrólisis, son atribuibles parcialmente al tamaño reducido de los péptidos en comparación con las proteínas, lo que promueve una mayor solubilidad, que les facilita migrar rápidamente a la interfaz aire-agua, desplegándose y reorganizándose en la interfaz (Tavano, 2013). En este sentido, Balti et al. (2010) reportaron que la CE de los hidrolizados de piel y vísceras de sepia común (*Sepia officinalis*), se ve mejorada con el proceso de hidrólisis cuando la reacción alcanza un GH bajo (5-10%), mientras que hidrolisis más extensas llevan a una disminución de la actividad.

En cuanto a la EE, los resultados muestran comportamientos similares a los encontrados para la CE; así la menor estabilidad se encontró con pH 4 y aumentó con el pH. El proceso de hidrólisis mejoró significativamente la estabilidad de la espuma para todas las condiciones de pH evaluadas ( $p < 0.05$ ), alcanzándose los mayores valores con el HVTR con GH de 4.2% para pH 4 y el HVTR 8.4% para pH 10. Adicionalmente, hidrolisis más extensas llevan a una disminución tanto de la CE como de la EE (figura 2). Resultados similares fueron reportados para hidrolizados de proteínas de huevos de atún listado, donde se encontró una menor estabilidad en la espuma formada a medida que aumentaba el GH; y se atribuyó dicha disminución al hecho de que péptidos con cadena más larga podrían formar una lamela alrededor de las burbujas de aire más gruesa y fuerte, que la formada por los péptidos más pequeños obtenidos por con una mayor hidrólisis (Intarasirisawat et al., 2012).

Finalmente se puede decir, que los valores de CE y EE encontrados para los HVTR, están dentro de los rangos encontrados para capacidad de formación de espuma (23-240%) y estabilidad de la espuma (20-140%) reportados para hidrolizados de proteínas de pescado (Halim et al., 2016). La CE y EE encontrada es superior a la de hidrolizados de cabeza y esqueleto de tilapia nilótica (Srikanya et al., 2017) y similar a la reportada para hidrolizados de piel y vísceras de sepia común (Balti et al., 2010). Así los resultados encontrados en cuanto a la CE y IAE, sugieren que las VTR representan un material con propiedades funcionales interesantes con potencial aplicación en la industria y que reacciones de hidrólisis con bajo GH pueden mejorar algunas características tecnofuncionales.

#### *Caracterización fisicoquímica y microbiológica*

En cuanto a la caracterización bromatológica del HVTR con GH de 4.2%, los resultados se presentan en la tabla 2, donde se reporta el valor promedio de la composición química proximal de las VTR enteras y desengrasadas, de diferentes lotes (el valor de carbohidratos se calculó por diferencia). Otros autores han señalado resultados de composición proximal de vísceras enteras de diversas especies, así por ejemplo Šližyte y colaboradores reportaron valores de lípidos y humedad para vísceras de bacalao, similares a los del presente estudio, pero mayores en proteína y cenizas (Šližyte et al., 2005). Villamil et al. (2017), hicieron un comparativo de la composición de vísceras de ocho especies piscícolas, y concluyeron que la variabilidad en la composición depende de la especie, estacionalidad, edad, sexo, consumo de nutrientes y otros factores; pero que en general existe un particular interés en nuevas estrategias para el uso de las vísceras de pescado, dado que tienen alto contenido en proteínas y aceite con ácidos grasos omega-3 de cadena larga. Respecto al HVTR, debido a la alta dilución utilizada para alcanzar la concentración de sustrato inicial para la hidrólisis (8 g proteína/L), los hidrolizados están compuestos mayoritariamente por agua. El valor de cenizas, pese a la alta dilución, es relativamente alto debido a la cantidad de NaOH adicionado para mantener constante el pH en el proceso de hidrólisis, que aumenta con relación al aumento del GH. En la tabla 2 se muestra que la proteína es el componente mayoritario de los HVTR, además del agua; sin embargo, el contenido de proteína es inferior a otros reportados para hidrolizados de vísceras de otras especies piscícolas, mientras que el contenido de cenizas y lípidos encontrados para las HVTR, se encuentran dentro de los rangos reportados para otros hidrolizados de vísceras de pescados (Šližyte et al., 2005; Villamil et al., 2017).

En cuanto a la calidad microbiológica, las VTR presentan un alto recuento de mesófilos aerobios y coliformes totales, lo cual es normal en este tipo de matrices, debido a su contenido intestinal. Sin embargo, en el hidrolizado el análisis microbiológico mostró una disminución considerable en los recuentos de mesófilos aerobios, coliformes totales y mohos y levaduras, comparado con la carga inicial de las VTR. Esto se debe al tratamiento térmico inicial aplicado para el proceso de inactivación de enzimas endógenas y desengrasado (90 °C) y al subsecuente calentamiento en el proceso de hidrólisis (60 °C), sumado a las condiciones de pH alcalino.

Tabla 2: Composición proximal de las VTR y el HVTR con GH 4,2%

Composición g/100g	VTR	VTR desengrasadas	HVTR
Humedad	61.34 ± 3.59	83.31 ± 1.11	98.53 ± 0.11 <sup>a</sup>
Lípidos	30.39 ± 5.18	1.83 ± 0.12	0.09 ± 0.01 <sup>a</sup>
Proteína	7.41 ± 1.02	9.36 ± 1.13	0.84 ± 0.05 <sup>a</sup>
Cenizas	1.03 ± 0.15	1.50 ± 0.23	0.27 ± 0.01 <sup>a</sup>
Carbohidratos	2.25	3.16	0.27

Actualmente en Colombia no se cuenta con ninguna normativa que regule subproductos de pesca y acuicultura; sin embargo, tomando como referencia la Norma Técnica Colombiana (NTC) 1325, para productos cárnicos procesados cocidos (Icontec, 2008), se observa que están dentro de los límites permitidos para identificar nivel de aceptable calidad (tabla 3).

Tabla 3: Recuento microbiológico y detección de patógenos en HVTR y VTR frescas

Microorganismo	NTC 1325 <sup>d</sup>	VTR	HVTR
Recuento mesófilos aerobio (UFC/g)	100000	5200	370
Recuento Coliformes totales (NMP/g)	500	450	45
Recuento de mohos y levaduras (UFC/g)	-	200	10
ECSR (UFC/g)	100	<100	<10
Detección de <i>E. coli</i> /25 g	<10	Ausencia	Ausencia
Detección de <i>Salmonella</i> sp. /25 g	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Detección de <i>Vibrio cholerae</i> /25 g	-	Ausencia	Ausencia

A partir del análisis de metales pesados se encontraron valores de 0.04, <0.2, 0.68, <0.08 y 16.11 mg/kg, para mercurio, arsénico, plomo, cadmio y cobre, respectivamente. Como se había mencionado anteriormente, en Colombia no se cuenta con normativa que regule subproductos de pesca y acuicultura, o productos elaborados a partir de los mismos. Sin embargo, existe la NTC 5443 que regula los productos de la pesca y acuicultura en este aspecto, específicamente para las especies de cachama, tilapia y trucha (Icontec, 2015), ante la cual las VTR están dentro de los límites en cuanto al contenido de mercurio (0.5 mg/kg) y cadmio (0.05 mg/kg), pero el valor encontrado para plomo es superior al permitido (0.3 mg/kg). Por otro lado, es importante considerar que la concentración de iones metálicos de la muestra puede influir sobre la actividad catalítica de la enzima. En este sentido, Kamran et al. (2015) estudiaron el efecto de diferentes iones metálicos sobre la actividad catalítica de una proteasa serin alcalina, tal como la Subtilisina Carlsberg que constituye el principal componente enzimático de la Alcalasa 2.4L.

Estos investigadores encontraron que la actividad catalítica de este tipo de enzimas puede verse potenciada o disminuida según el ion metálico. Específicamente, dentro de los iones metálicos encontrados en la VTR, los autores evidenciaron que concentraciones de 5 mM de mercurio y cobre, ocasionan una disminución en la capacidad catalítica de la enzima de un 70 y 50%, respectivamente; efecto que puede deberse a la interacción de los iones con el grupo tiol de la cisteína, ocasionando ruptura de los enlaces disulfuro y desestabilización de la estructura de la enzima (Kamran et al., 2015). Sin embargo, se debe mencionar que las concentraciones usadas para evaluar el efecto de los iones metálicos sobre la enzima, fue más de 20 veces superior, a la concentración encontrada en las vísceras, por lo que se podría pensar que el efecto de inhibición puede ser muy bajo o nulo en el proceso de hidrólisis de VTR.

No obstante, teniendo en cuenta que las vísceras no se usan directamente para la hidrólisis, sino que se aplica una dilución de más de 10, los valores de plomo y todos los demás metales en los HVTR, estaría por debajo de los límites máximos permisibles por la norma. Para comprobarlo, se realizó el análisis de plomo en el HVTR, encontrándose un valor de 0.058 mg Pb/kg de HVTR, el cual es inferior al límite de 0.3 mg Pb/kg, dado en la norma (Icontec, 2015). Estos resultados indican que los HVTR son seguros para el consumo, en cuanto a su calidad microbiológica y contenido de metales pesados.

#### Calidad nutricional de las VTR y HVTR

El perfil de aminoácidos de las VTR y el HVTR con GH 4.2%, el cual proporciona información de importancia para analizar la calidad nutricional de su proteína, se detalla en la tabla 4, en la cual se incluye la sumatoria de aminoácidos esenciales (AAE), aminoácidos no esenciales (AANE) y aminoácidos hidrofóbicos (AAH), y además, en la columna de referencia, se indican los valores establecidos por la FAO como referencia para

adultos (WHO/FAO/UNU, 2007). En términos generales se puede notar un perfil de aminoácidos similar tanto en las VTR como en el HVTR, donde el aminoácido más abundante es la Gly, con un contenido alrededor del 23%, seguida de Lys con aproximadamente 9%. Cabe resaltar, que la hidrólisis ácida desarrollada durante la determinación destruye por completo el Trp, por lo tanto, dicho aminoácido no fue incluido en los resultados (Abdelhedi et al., 2016).

Por otro lado, el alto contenido de Lys en las VTR y los HVTR, en comparación con otras proteínas de interés alimentario como trigo, garbanzo y leche en polvo, que presentan una concentración de Lys de 2.5, 7 y 8 g/100 g proteína, respectivamente (WHO/FAO/UNU, 2007), puede proporcionar una oportunidad para ser utilizado en la suplementación alimentos. Adicionalmente se puede ver que las VTR y el HVTR, contienen alrededor del 37% del total de aminoácidos potenciadores del sabor (Glu, Asp, Gly y Ala), lo cual puede ser de gran interés para su uso como un aditivo alimentario.

La evaluación de la calidad de las proteínas tiene como objetivo determinar la capacidad de las fuentes de proteínas de los alimentos y las dietas, para satisfacer la demanda metabólica de aminoácidos y nitrógeno (WHO/FAO/UNU, 2007). En este sentido según la FAO/OMS, para adultos la proporción de AAE/ AANE, no debe ser inferior a 0.6 y la proporción de AAE/AA totales no debe ser inferior al 0.4. Considerando los resultados (Tabla 4), se puede decir que las VTR y los HVTR son una fuente de proteínas de alta calidad, dado que tienen una proporción de aminoácidos esenciales/aminoácidos no esenciales que oscila entre 1 y 1.1 y una proporción de aminoácidos esenciales/aminoácidos totales de 0.5.

Tabla 4. Composición de aminoácidos totales de las VTR, el HVTR con GH 4.2% y requerimientos sugeridos de AAE para adultos por la FAO.

Aminoácidos (AA)	Concentración (g/ 100g de proteína)		
	VTR	HVTR	Referencia
Arg	6.7	6.5	-
His	9.7	6.7	1.5
Ile	3.0	2.7	1.5
Leu	7.2	9.0	2.1
Lys	9.0	9.8	1.8
Met	2.9	2.1	-
Phe	1.3	1.2	-
Thr	6.1	6.1	1.1
Val	4.7	4.2	1.5
Met + Cys			2.0
Phe+Tyr			2.1
Ala	3.6	4.0	
Asp/Asn	2.8	3.0	
Cys			
Glu/Gln	6.5	6.9	
Gly	23.0	22.8	
Ser	4.6	5.0	
Tyr	3.8	3.8	
AAE*	50.5	48.3	
AANE*	44.4	45.5	
AAH*	45.7	46.0	
AA totales	94.9	93.9	
AAE/AANE	1.1	1.1	
AAE/AA	0.5	0.5	

Respecto al contenido de aminoácidos en relación a las propiedades tecnofuncionales encontradas, principalmente la CE, EE y IEE, es importante mencionar que el carácter anfílico, es decir, la distribución hidrófila o hidrófoba de los aminoácidos en la secuencia de los fragmentos peptídicos, parece ser el criterio crucial para formar emulsiones estables, formación de espuma y estabilidad de la espuma (Görgüç et al., 2020). En este sentido se puede ver que tanto las VTR como el HVTR tiene un buen balance de aminoácidos

hidrofóbicos e hidrofílicos, con un 49 y 51% respectivamente; lo que podría llevar a contener distintas zonas de regiones hidrófobas e hidrófilas dentro de un peso molecular mínimo. Por su parte la hidrólisis enzimática, puede llevar a un aumento en la superficie hidrófoba de las moléculas de proteína, permitiendo que los hidrolizados presenten mejores propiedades tecnofuncionales que las proteínas nativas (García-Arteaga et al., 2020).

## CONCLUSIONES

El GH y el pH de la solución, tienen efecto sobre las propiedades tecnofuncionales de los hidrolizados de VTR. Es así como la hidrólisis enzimática de VTR puede mejorar significativamente el índice de estabilidad de la emulsión, la capacidad espumante y la estabilidad de la espuma, cuando se trabaja con GH bajos. Las VTR sin hidrolizar poseen un alto índice de actividad emulsificante, superior a los valores reportados para otros subproductos piscícolas, pero el proceso de hidrólisis provoca una disminución en la capacidad emulsificante de los HVTR. Los HVTR presentan buena calidad microbiológica y aceptable contenido de metales pesados. Adicionalmente se encontró que tanto las VTR como los HVTR, son una fuente de proteínas de alta calidad nutricional con una proporción de aminoácidos esenciales/aminoácidos no esenciales de 1.1; y que presentan un balance de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos adecuado para resaltar las propiedades tecnofuncionales.

## NOTACIÓN

### *Símbolos*

B= volumen consumido de base (L)

$M_p$ = masa de la proteína (kg)

$N_B$ = concentración de la base (N)

$\alpha$ = grado de disociación de los grupos aminos liberados en la reacción

$h_t$  = número de enlaces peptídicos totales en la proteína nativa por unidad de peso

T = temperatura (K)

A = absorbancia de la emulsión diluida

FD = factor de dilución

C = concentración de proteína ( $g/m^3$ )

$\Phi$  = fracción de volumen de aceite en la emulsión

L = longitud óptica de la celda (m)

V = volumen antes del batido (mL)

$V_0$  = volumen de espuma en el tiempo 0 (mL)

$V_{10}$  = volumen de espuma pasados 10 min de la homogenización (mL)

### *Abreviaciones*

VTR = vísceras de tilapia roja

GH = grado de hidrólisis

HVTR = hidrolizados de vísceras de tilapia roja

HPLC = cromatografía líquida de alta eficacia

IAE = índice de actividad emulsificante

IEE = índice de estabilidad de la emulsión

CE = La capacidad espumante

EE = estabilidad de la espuma

UFC/g: Unidades formadoras de colonia por gramo de VTR

NMP/g: Número más probable por gramo de VTR

ECSR: Esporas *Clostridium* sulfito reductor

AAE = aminoácidos esenciales

AANE = aminoácidos no esenciales

AAH = aminoácidos hidrofóbicos

## AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo agradecen a la estrategia de Sostenibilidad del Comité para el Desarrollo de la Investigación en la Universidad de Antioquia (CODI) y al programa de financiación de Proyectos de Investigación Especiales (PIE- ECBTIPIE132020) de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia.

**REFERENCIAS**

- Abdelhedi, O., Jridi, M., y otros 6 autores, Combined biocatalytic conversion of smooth hound viscera: protein hydrolysates elaboration and assessment of their antioxidant, anti-ACE and antibacterial activities, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.05.013>, *Food Res Int*, 86, 9–23 (2016)
- AOAC., Official Methods of Analysis (17th ed.), Association of Official Analytical Chemists (2006)
- Arias, L., Gómez, L. J., y Zapata, J. E., Efecto de temperatura-tiempo sobre los lípidos extraídos de vísceras de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) utilizando un proceso de calentamiento-congelación, <https://doi.org/10.4067/s0718-07642017000500014>, *Inf.Tecnol.*, 28(5), 131–142 (2017)
- Balti, R., Bougatef, A., y otros 4 autores, Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin i-converting enzyme-inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia Officinalis*) by-products, <https://doi.org/10.1002/jsfa.4045>, *J Sci Food Agric*, 90(12), 2006–2014 (2010)
- Batista, I., Ramos, C., y otros 3 autores, Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.07.019>, *Process Biochem*, 45(1), 18–24 (2010)
- Calderón-Chiu, C., Calderón-Santoyo, M., Herman-Lara, E., y Ragazzo-Sánchez, J. A., Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus Lam*) leaf as a new source to obtain protein hydrolysates: physicochemical characterization, techno-functional properties and antioxidant capacity, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106319>, *Food Hydrocolloids*, 112, 106319, (2021)
- Estévez, N., Fuciños, P., y otros 5 autores, Influence of pH on viscoelastic properties of heat-induced gels obtained with a  $\beta$ -lactoglobulin fraction isolated from bovine milk whey hydrolysates, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.137>, *Food Chem*, 219, 169–178 (2017)
- FAO., El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020, la sostenibilidad en acción, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, <https://doi.org/10.4060/ca9229es>, Roma (2020)
- Forghani, B., Ebrahimpour, A., y otros 4 autores, Enzyme hydrolysates from stichopus horrens as a new source for angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/236384>, *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 1–9 (2012)
- García-Arteaga, V., Apéstegui-Guardia, M., y otros 3 autores, Effect of enzymatic hydrolysis on molecular weight distribution, techno-functional properties and sensory perception of pea protein isolates, <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102449>, *Innovative Food Sci Emerg Technol*, 65, 102449 (2020)
- Gómez, L. J., Gómez, N. A., y otros 4 autores, Optimization of the red tilapia (*Oreochromis spp.*) viscera hydrolysis for obtaining iron-binding peptides and evaluation of in vitro iron bioavailability, <https://doi.org/10.3390/foods9070883>, *Foods*, 9(7), 883 (2020)
- Gómez, L. J., y Zapata, J. E., Efecto del nivel de grasa y velocidad de agitación en la hidrólisis enzimática de vísceras de tilapia roja (*Oreochromis sp.*), <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000400007>, *Info Tecnol*, 28(4), 47–56 (2017)
- Görgüç, A., Gençdağ, E., y Yılmaz, F. M., Bioactive peptides derived from plant origin by-products: biological activities and techno-functional utilizations in food developments – a review, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109504>, *Food Res Int*, 136, 109504 (2020)
- Halim, N. R. A., Yusof, H. M., y Sarbon, N. M., Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: a comprehensive review, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.02.007>, *Trends Food Sci Technol*, 51, 24–33, (2016)
- ICONTEC, NTC 4132., Microbiología. Guía general para el recuento de mohos y levaduras. Técnica de recuento de colonias a 25 °C, In Icontec (Ed.), Norma Técnica Colombiana (1997)
- ICONTEC, NTC 1325., Industrias alimentarias. Productos cárnicos procesados no enlatados. In Icontec (Ed.), Norma Técnica Colombiana, 1–40 (2008)
- ICONTEC, NTC 5443 Productos provenientes de la acuicultura. Buenas prácticas de proceso, transporte y comercialización de las especies cachama, mojarra - tilapia y trucha. In Icontec (Ed.), Norma Técnica Colombiana, (2015)
- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessanguan, W., y Wu, J., Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus Pelamis*) Roe, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.076>, *Food Chem*, 135(4), 3039–3048 (2012)
- Jemil, I., Jridi, M., y otros 6 autores, Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by bacillus subtilis A26, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.004>, *Process Biochem*, 49(6), 963–972 (2014)
- Kamran, A., Rehman, H.U., y otros 3 autores, Purification and characterization of thiol dependent, oxidation-stable serine alkaline protease from thermophilic *Bacillus sp.*, *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 13(1), 59-64 (2015)
- Lacou, L., Léonil, J., y Gagnaire, V., Functional properties of peptides: from single peptide solutions to a mixture of peptides in food products, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.028>, *Food Hydrocolloids*, 57, 187–199 (2016)

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J., Protein measurement with the folin phenol reagent, <http://www.jbc.org>, J Biol Chem, 193(1), 265–275 (1951)

Mokni Ghribi, A., Maklouf Gafsi, I., y otros 6 autores, Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.109>, Food Chem, 187, 322–330 (2015)

Sepúlveda, C. T., Zapata, J. E., y otros 4 autores, The preferential use of a soy-rape seed lecithin blend for the liposomal encapsulation of a tilapia viscera hydrolysate, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110530>, LWT, 110530 (2020)

Šližyte, R., Daukšas, E., y otros 3 autores, Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.016>, Process Biochem, 40(6), 2021–2033 (2005)

Srikanya, A., Dhanapal, K., y otros 3 autores, A study on optimization of fish protein hydrolysate preparation by enzymatic hydrolysis from tilapia fish waste mince, <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.612.375>, Int J Curr Microbiol App Sci, 6(12), 3220–3229 (2017)

Tavano, O. L., Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>, J Mol Catal B: Enzym, 90, 1–11 (2013)

USEPA., U.S. Environmental protection agency, sw-846 epa method 3051a, microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils, en: test methods for evaluating solid waste (3a edición, p. 25), U.S. Environmental Protection Agency (1998)

Villamil, O., Váquiro, H., y Solanilla, J. F., Fish viscera protein hydrolysates: production, potential applications and functional and bioactive properties, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.057>, Food Chem, 224, 160–171 (2017)

WHO/FAO/UNU., Protein and amino acid requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation, WHO Press (2007)