

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE PESQUERÍA



**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE UN
HIDROLIZADO PROTEICO ENZIMÁTICO OBTENIDO A PARTIR
DE SUBPRODUCTOS DE TRUCHA
(*Oncorhynchus mykiss*)”**

TESIS PARA OPTAR TÍTULO DE INGENIERO PESQUERO

FRANCESCA MELANIE PÉREZ GONZALES

LIMA-PERÚ

2024

**La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art.24 –Reglamento de Propiedad Intelectual)**

TESIS FINAL

INFORME DE ORIGINALIDAD

2%

INDICE DE SIMILITUD

2%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

www.scielo.org.mx

Fuente de Internet

<1%

2

dspace.uclv.edu.cu

Fuente de Internet

<1%

3

docplayer.es

Fuente de Internet

<1%

4

notablesdelaciencia.conicet.gov.ar

Fuente de Internet

<1%

5

repository.unad.edu.co

Fuente de Internet

<1%

6

Submitted to Murrieta Valley Unified School District

Trabajo del estudiante

<1%

7

dev.scielo.org.pe

Fuente de Internet

<1%

8

Submitted to Universidad de Guadalajara

Trabajo del estudiante

<1%

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE PESQUERÍA

**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE UN
HIDROLIZADO PROTEICO ENZIMÁTICO OBTENIDO A
PARTIR DE SUBPRODUCTOS DE TRUCHA
(*Oncorhynchus mykiss*)”**

Presentada por:

FRANCESCA MELANIE PÉREZ GONZALES

Tesis para optar el título de:

INGENIERO PESQUERO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Mg. Sc. David Julián Roldan Acero

Presidente

M. Agric. Raúl Del Carmen Porturas Olaechea

Miembro

M. Sc. Tito Eduardo Llerena Daza

Miembro

Mg. Sc. Juan Rodolfo Omote Sibina

Asesor

Lima, 2024

DEDICATORIA

A Dios por darme fuerzas para seguir y no rendirme con uno de mis logros en esta vida.

A mi abuelito que lo llamaba “hijito”, sé que no está con nosotros físicamente, pero sé muy bien que está muy orgulloso de mí por estar cumpliendo mis sueños.

A mis padres, hermanos, abuelas, bisabuela, tíos y primos por estar incondicionalmente.

AGRADECIMIENTO

A mi hijito, que siempre me acompañó en los buenos momentos y sobre todo en las caídas, brindándome valor para no rendirme y apoyándome en todo lo que yo quisiera en esta vida. Sobre todo, le agradezco a él y a mi mamá por ser la persona que soy ahora.

A mis padres, hermanos, abuelas, bisabuela, padrinos, tíos y primos, por impulsarme de que todo es posible, solo con perseverancia y dedicación se logra lo que uno desea. Además, saben muy bien las pestañas que he quemado, horas sin dormir, y sobre todo “perdiendo celulares”, mientras dormía en los autobuses para poder ir a UNALM a desarrollar la tesis.

A mi asesor, por tenerme paciencia, compartir sus conocimientos y en respetar mis locuras decisiones en este laberinto de la culminación de mi tesis.

A mis profesores de la UNALM como al Ing. Raúl Porturas, Ing. Andrés Molleda, Ing. C. Pizardi, Ing. T. Llerena etc., personas de gran sabiduría que nos han ayudado a desarrollarnos a mis compañeros y a mí durante el tiempo de formación académica.

A Wendy y Roy, que me ayudaron demasiado en el proceso experimental, por ejemplo, brindándome sus “tips” en el uso de algunos equipos o metodologías. Asimismo, el apoyo emocional que se necesita en este transcurso de la realización de la tesis.

A mis amistades Minako M., Melanie D., Suali V., María R., Natali M., Melissa A., Alejandro C., Pierre R., Rodrigo G. y Marcio M., que también estuvieron incondicionalmente y dándome valor cada día en no rendirme, diciendo “ya falta poco en terminar”, “solo un esfuerzo más y lo lograrás”.

A mis jefes Roció M. y Josehp G. que me apoyaron con los permisos y con lo ánimos en seguir adelante en la finalización de mi tesis.

Muchísimas gracias a todos por estar allí.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Definiciones.....	3
2.2. La trucha: acuicultura y procesamiento	4
2.3. Enzima.....	6
2.4. Hidrólisis.....	9
2.4.1.Hidrólisis enzimática de proteínas	9
2.5. Grado de Hidrólisis.....	10
2.5.1.Clasificación de los hidrolizados	10
2.6. Propiedades funcionales de los hidrolizados.....	11
2.6.1.Propiedades biofuncionales.....	12
2.6.2.Alimentos funcionales	12
2.7. Radicales libres.....	12
2.8. Antioxidantes.....	13
2.9. Mecanismo de los antioxidantes	14
2.10.Capacidad antioxidante.....	15
2.10.1.Mecanismos de reacción.....	15
III.METODOLOGÍA	20
3.1. Lugar de ejecución.....	20
3.2. Materia Prima	20

3.3. Materiales, equipos y reactivos	20
3.3.1. Materiales	20
3.3.2. Equipos	21
3.3.3. Reactivos	22
3.4. Métodos de análisis	23
3.4.1. Análisis físico-químico	23
3.4.2. Determinación del grado de hidrólisis	21
3.4.3. Métodos para determinar la capacidad antioxidante	25
3.5. Metodología procedimental	27
3.6. Diseño experimental y Análisis estadístico	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1. Análisis sensorial	33
4.2. Análisis físico-químico de la Materia Prima	35
4.3. Proceso de hidrólisis enzimática de subproductos de trucha	36
4.3.1. Optimización del proceso de hidrólisis enzimática extensiva utilizando la enzima Protamex	36
4.3.1.1 Análisis de la Superficie de Respuesta	40
4.3.1.2. Valores óptimos del grado de hidrólisis de la enzima Protamex	42
4.3.2. Optimización del proceso de hidrólisis enzimática extensiva utilizando la enzima Flavourzyme	42
4.3.2.2. Análisis de la superficie de respuesta	47
4.3.2.3. Optimización del grado de hidrólisis de la enzima Flavourzyme	48
4.4. Determinación de la Capacidad Antioxidante	49
4.4.1. Método ABTS (Ácido 2,2' - azino-bis-(3-etiltiazolinabencenosulfónico-6))	49

4.4.2.Método del DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo).....	51
V. CONCLUSIONES	54
VI.RECOMENDACIONES	55
VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
VIII.ANEXOS.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Propiedades funcionales de los hidrolizados proteicos.....	11
Tabla 2: Comparación de métodos para medir capacidad antioxidante	19
Tabla 3: Factores y niveles para la obtención de hidrolizados a partir de los subproductos de la trucha arcoíris.....	30
Tabla 4: Diseño experimental de Box Behnken con sus variables independientes (%enzima, MP:solvente y tiempo) de la enzima Protamex.....	31
Tabla 5: Diseño experimental de Box Behnken con sus variables independientes (%enzima, MP:solvente y tiempo) de la enzima Flavourzyme	32
Tabla 6: Evaluación sensorial de los subproductos de trucha (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	33
Tabla 7: Valoración de los subproductos de la trucha arcoíris.....	34
Tabla 8: Evaluación sensorial de los subproductos de la trucha arcoíris	35
Tabla 9: Composición química proximal de subproductos de la trucha arco iris.....	35
Tabla 10: Resultados del proceso de hidrólisis utilizando la enzima Protamex en función de diferentes valores de las variables independientes	36
Tabla 11: Análisis de varianza del modelo ajustado para grado de hidrólisis de la enzima Protamex.....	38
Tabla 12: Valores óptimos de los factores (%enzima, tiempo y MP:solvente.) para obtener un hidrolizado proteico extensivo	42
Tabla 13: Resultados del proceso de hidrólisis utilizando la enzima Flavourzyme en función de diferentes valores de las variables independientes	43
Tabla 14: Análisis de varianza del modelo ajustado para la variable respuesta (grado de hidrólisis) de la enzima Flavourzyme	45
Tabla 15: Valores óptimos de los factores (%enzima, tiempo y mp: solvente.) para obtener un hidrolizado proteico extensivo	48

Tabla 16: Capacidad antioxidante por el método del ABTS de la enzima Protamex y Flavourzyme de los 15 tratamientos.....49

Tabla 17: Capacidad antioxidante por el método del DPPH de la enzima Protamex y Flavourzyme de los 15 tratamientos.....51

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1. Cosecha de la trucha arcoíris entre los años 2012 – 2021 en TM	5
Figura 2. Forma de acción de las endoproteasas y exoproteasas	7
Figura 3. Proteasas comerciales en hidrolizados de proteínas	8
Figura 4. Mecanismo catalítico de una proteasa.....	9
Figura 5. Etapas en la hidrólisis enzimática de proteínas	10
Figura 6. Interacción entre radicales libres y antioxidantes	15
Figura 7. Reacción de transferencia de átomos de hidrógeno.....	16
Figura 8. Reacción de transferencia de un electrón.	16
Figura 9. Flujograma para la obtención del hidrolizado proteico enzimático extensivo a partir de los subproductos de la trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	27
Figura 10. Comportamiento de los efectos principales de las variables independientes en el proceso de optimización de GH (Protamex).....	39
Figura 11. Superficies de respuesta para el grado de hidrólisis de la enzima Protamex en función a %Enzima y tiempo. (Factor constante: Relación MP:solvente=1.0).....	41
Figura 12. Comportamiento de los efectos principales de las variables independientes en el proceso de optimización de GH (Flavourzyme).....	46
Figura 13. Superficie de respuesta para el grado de hidrólisis de la enzima Flavourzyme en función al %Enzima y tiempo. (Factor constante: Relación MP:solvente=1.0).....	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.Homogenización de residuos de trucha con agua destilada.....	74
Anexo 2.Medición del pH para la obtención del hidrolizado proteico	75
Anexo 3.Las muestras en baño maría (control de temperatura).....	75
Anexo 4.Inactivación de la enzima.....	76
Anexo 5.Centrifugación	76
Anexo 6.Obtención del hidrolizado	77
Anexo 7.Curva de calibración del grado de hidrólisis	78
Anexo 8.Diferentes concentraciones de glicina para la obtención de la curva del grado de hidrólisis	78
Anexo 9.Grado de hidrólisis de la enzima Flavourzyme de las 15 muestras de hidrolizado	79
Anexo 10.Grado de hidrólisis de la enzima Protamex de las 15 muestras de hidrolizado	80
Anexo 11.Hidrólisis ácida de los subproductos de la trucha arcoíris	81
Anexo 12.Curva de calibración del ABTS	82
Anexo 13.Diferentes concentraciones de trolox para la obtención de la curva del ABTS.	82
Anexo 14.Soluciones de Persulfato de potasio, trolox y ABTS ⁺	83
Anexo 15.Curva de calibración del DPPH	83
Anexo 16. Diferentes concentraciones de trolox para la obtención de la curva del DPPH.....	84
Anexo 17.Solución del DPPH y diferentes concentraciones de trolox.....	84
Anexo 18.Determinación de la curva estándar Glicina	85
Anexo 19.Determinación de la curva estándar Trolox (ABTS)	85
Anexo 20.Determinación de la curva estándar Trolox (DPPH)	86

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como finalidad aprovechar los subproductos de la trucha arco iris en la elaboración de un hidrolizado enzimático y determinar la presencia de péptidos con capacidad antioxidante, ya que por lo general estos subproductos son eliminados a los ríos o son enterrados originando un potencial daño al medio ambiente.

En la investigación se analizó el efecto de dos tipos de enzimas (Protamex y Flavourzyme) para realizar el proceso de hidrólisis y determinar cuál de las dos presentaba mayor capacidad antioxidante, para ello se aplicó un diseño superficie de respuesta del tipo Box Behnken con 15 tratamientos, donde se buscó optimizar las variables independientes: porcentaje de enzima, tiempo y relación MP: solvente en función de la variable respuesta grado de hidrólisis (GH).

Los resultados obtenidos después de la optimización para la enzima Flavourzyme fueron: grado de hidrólisis 63,35 % aplicando 0,5 % de enzima, 180 minutos y una relación mp:solvente de 0,50 g trucha/ ml H₂O; para la enzima Protamex fueron 52,08 % de grado de hidrólisis, 0,5 % de enzima, 120,6 minutos y una relación MP:solvente de 0,50 g trucha/ml H₂O.

Por otro lado, la capacidad antioxidante después de realizado el proceso de hidrólisis utilizando las enzimas Protamex y Flavourzyme mediante la metodología DPPH fue de 76,44 y 74,97 por ciento de inhibición y ABTS fue de 16702,79 y 6545,20 TEAC respectivamente.

Se concluye que el hidrolizado proteico obtenido por la enzima Flavourzyme tuvo mayor grado de hidrólisis que el Protamex, por otro lado, se determinó que la influencia de la enzima Protamex sobre la liberación de péptidos antioxidantes durante el proceso de hidrólisis fue mejor que la encontrada utilizando la enzima Flavourzyme.

Palabras clave: Protamex, Flavourzyme, grado de hidrólisis, ABTS, DPPH, enzima, tiempo y relación materia prima solvente

ABSTRACT

The purpose of this research work was to take advantage of rainbow trout by-products in the preparation of an enzymatic hydrolyzate and to determine the presence of peptides with antioxidant capacity, since these by-products are generally disposed of in rivers or are buried, causing potential damage to the environment.

The research analyzed the effect of two types of enzymes (Protamex and Flavourzyme) to carry out the hydrolysis process and determine which of the two had the greater antioxidant capacity. For this purpose, a Box Behnken-type response surface design with 15 treatments was applied, where the independent variables: percentage of enzyme, time and MP:solvent ratio were optimized according to the response variable degree of hydrolysis (GH).

The results obtained after optimization for the Flavourzyme enzyme were: degree of hydrolysis 63.35 % applying 0.5 % enzyme, 180 minutes and a MP:solvent ratio of 0.50 g trout/ml H₂O; for the Protamex enzyme were 52.08 % degree of hydrolysis, 0.5 % enzyme, 120.6 minutes and a MP:solvent ratio of 0.50 g trout/ml H₂O.

On the other hand, the antioxidant capacity after the hydrolysis process using Protamex and Flavourzyme enzymes by DPPH methodology was 76.44 and 74.97 percent inhibition and ABTS was 16702.79 and 6545.20 TEAC respectively.

It is concluded that the protein hydrolysate obtained by the Flavourzyme enzyme had a higher degree of hydrolysis than the Protamex, on the other hand, it was determined that the influence of the Protamex enzyme on the release of antioxidant peptides during the hydrolysis process was better than that found using the Flavourzyme enzyme.

Keywords: Protamex, Flavourzyme, degree of hydrolysis, ABTS, DPPH, enzyme, time and solvent raw material ratio.

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura y la extracción son dos actividades de la pesquería que contribuyen al desarrollo económico del país, pero que a su vez generan una gran magnitud de subproductos que no son aprovechados de forma adecuada, por lo general son desechados directamente a los cuerpos de agua generando así su contaminación (Grillo *et al.*, 2018).

La trucha en el Perú está considerada como una de las principales especies de cultivo en aguas continentales, donde presenta una cosecha anual de 51 580,59 TM (PRODUCE, 2022) por lo que genera grandes volúmenes de subproductos por las actividades de procesamiento primario, éstos se componen de piel, aletas, cabezas, vísceras, entre otros y representan el 60% del peso total; mientras que el 40 % se asigna al consumo humano directo (Zapata *et al.*, 2019).

Una de las formas de aprovechar los subproductos generados por el procesamiento primario de la trucha es obteniendo un hidrolizado proteico a partir de ellos. Esta metodología permite obtener productos de alto valor nutritivo, valor agregado y propiedades funcionales bioactivas (Zapata *et al.*, 2017).

En el proceso de hidrólisis se liberan péptidos de diferentes pesos moleculares, a los cuales atribuyen características funcionales como la capacidad antioxidante, mecanismo por el cual otras moléculas se unan al oxígeno e interactúan más rápido con los radicales libres, evitando un desbalance del sistema oxidativo que afecta al cuerpo humano ocasionando problemas cardiovasculares, gástricos, respiratorios, neurológicos, endocrinológicos, así como, cáncer, y envejecimiento (Coronado *et al.*, 2015; Arias *et al.*, 2016).

A pesar de los resultados favorables disponibles en la literatura, existen pocos estudios que evalúen la obtención de péptidos biológicamente activos a partir de restos de

subproductos de la trucha arco iris. Por lo que, la presente investigación tuvo como objetivo general evaluar la capacidad antioxidante del hidrolizado proteico enzimático extensivo a partir de subproductos de trucha mediante las metodologías ABTS y DPPH. Y como objetivos específicos se plantearon:

- Determinar la influencia de las variables (porcentaje de enzima, tiempo y relación MP:solvente) en el proceso de hidrólisis comparando dos enzimas (Protamex y Flavourzyme).
- Optimizar los procesos de obtención de hidrolizado proteico enzimático extensivo, mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

En la actualidad existen diversas concepciones sobre la definición de subproductos, residuos, y desechos los cuales son muy similares, es por ello que se detallarán a continuación:

2.1. Definiciones

a. Subproductos

De acuerdo con Rodríguez et al., (2011) son productos obtenidos de las materias primas, que no son idóneos para el consumo humano directo como la especie, tamaño, calidad, disponibilidad de procesos de elaboración, los desechos de pescados provenientes de la elaboración de productos alimenticios o las partes restantes (huesos, aletas, escamas, intestino, vejiga natatoria, piel, riñones y otros).

Rustad et al. (2011) define como vísceras, cabezas, cortes, huesos, piel y pescado que está dañado o no es apto para el consumo humano (o procesamiento posterior) y la captura incidental. Rustad también indica que podrían representar hasta el 75% de las capturas dependiendo de los procesos de preparación industrial o post cosecha. Por otro lado, en Noruega lo considera que no son productos de ventas ordinarias (filete, pescado redondo, eviscerado o descabezado), pero que podrían reciclarse después del tratamiento. Bechtel *et al.* (2019) mencionan que, son desechos de la materia prima y que se puede apreciar en cantidades variables (cabezas, vísceras, estructuras y piel) y cantidades menores (sangre y aletas), éstos que no son dirigidos para el consumo humano, podría mostrar más del 60% del peso del pescado.

Además, FAO (2018) indica que los subproductos como las cabezas, las vísceras y las espinas dorsales; representan entre el 30% y el 70% del recurso hidrobiológico.

b. Descarte

Según el Decreto Supremo N° 017-2011-PRODUCE, “los descartes son aquellos recursos hidrobiológicos que, por su condición de alteración, descomposición o contaminación, sean enteros o por piezas, son declarados no aptos para el consumo humano por el control de calidad del que recibe el recurso o por el órgano competente en materia de sanidad pesquera. Los descartes se generan desde el desembarque hasta la recepción previa al procesamiento en el establecimiento industrial o artesanal pesquero para consumo humano directo, o antes de las tareas previas que se lleven a cabo en los Desembarcaderos Pesqueros Artesanales. Esta definición no incluye a aquellas especies seleccionadas o clasificadas por talla, peso o calidad, sin perjuicio de lo dispuesto en la Primera Disposición Complementaria Final del presente Reglamento”.

Asimismo, el Decreto Supremo N° 020-2022-PRODUCE, indica que “el material de descarte es la merma o subproducto que resulta de procesos productivos, el cual se constituye en un insumo directamente aprovechable en actividades del mismo rubro o giro, u otras actividades productivas, extractivas o de servicios”.

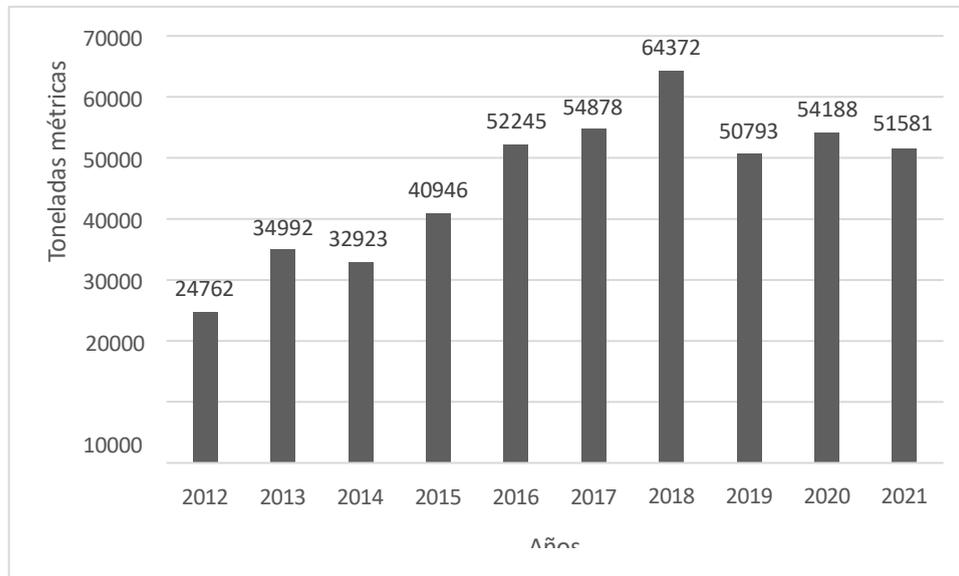
2.2. La trucha: acuicultura y procesamiento

PRODUCE (2022) reporta que, la acuicultura en el Perú representa 39,4% en la cosecha de recursos hidrobiológicos de origen continental y 60,6%, de origen marítimo en el 2021, las principales especies cosechadas son la concha de abanico (36,4%), trucha (34,2%), langostino (24,2%), tilapia (2,3%), paco (1,8%) y otros (1,1%). Asimismo, los departamentos principales en la cosecha de trucha son Puno (32 673,93 TM), Huancavelica (5 163,77 TM), Junín (3 641,57 TM), Pasco (5 751,10 TM), Cuzco (1 383,00 TM), Ayacucho (992,54 TM) y Lima (351,42 TM). Además, en la cosecha de la trucha presenta 51 580,59 TM, donde la línea de fresco es de 39 196 TM y el de congelado es 12 384,59 TM.

Según reportes de PRODUCE (2022), en el 2018 la trucha presentó la mayor cosecha con 64 372 TM; mientras que el 2012 se registró la menor cosecha con 24 762 TM (Figura 1).

Figura 1

Cosecha de la trucha arcoíris entre los años 2012 – 2021 en TM



Nota: Elaborado en base a PRODUCE (2022).

PRODUCE (2022) informa que, la cosecha de la trucha arco iris en el 2021 es de 51 580.59 TM, donde podríamos deducir que según la relación de gramos de residuos y gramos de pescado entero por Bozoglu et al. (2009), la cantidad de residuos es 30 948,35 - 36 106,41 TM. Asimismo, Cavieres (2010), menciona en su literatura que el rendimiento de la trucha está constituido por las vísceras (8 %), Cabeza (12 %), esquelón (3,1 %) y piel (1,2 %).

Los subproductos del procesamiento de recursos hidrobiológicos como huesos, piel, cabeza y vísceras representan aproximadamente 60-70 g / 100 g del peso del pescado (Bozoglu et al., 2009, citado por Albuzio et al., 2011).

Martínez (2003) reportó que, el rendimiento de los diferentes tipos de procesamiento de productos pesqueros es bajo, debido a la incorporación del valor agregado. Por ejemplo, para los productos congelados, las pérdidas en peso presentan al 28 %, para conserva en trozo (incluye esqueleto y piel) a 38 % y para la conserva de pescado desmenuzado un 60 %. Estas pérdidas porcentuales, son residuos primarios generados en el procesamiento de la trucha; donde el 60 % son residuos sólidos y el 40 % restante son transportados por aguas residuales.

La elaboración de una tonelada de pescado como producto congelado sin cabeza de especies salmonadas, presenta 27,86% de residuos, en donde el 17 % es residuo sólido y el 10,86 % es residuo líquido (evacuado en las aguas residuales).

Asimismo, en la elaboración de conservas, el pescado descamado es seleccionado de acuerdo con la calidad (conservas de pescado en trozo o pescado desmenuzado). En esta selección, los de mejor calidad (82,5 %) siguen directamente a trozado y el de menor consistencia (17,5%) a cocción para ser posteriormente desmenuzado (Martínez, 2003).

2.3. Enzima

Es un biocatalizador que permite acelerar la velocidad de la reacción y sin sufrir modificaciones en su estructura o su función (regresa a su estado original), y disminuye la energía de activación (es la cantidad de energía que se requiere para que la reacción se lleve a cabo). La función de la enzima es la actividad enzimática; es decir, la capacidad que tiene la enzima para acelerar la reacción se puede calcular mediante el número de sustrato que desaparece o el número de producto formado por unidad de tiempo; en otras palabras, se determina la velocidad de la reacción o la cinética enzimática (Grajales, 2005).

Grajales (2005) menciona que, a bajas concentraciones de sustrato la velocidad de la reacción enzimática es directamente proporcional a la concentración de este, siendo una reacción de primer orden. Por otro lado, a concentraciones medias de sustrato, la velocidad de la reacción enzimática ya no es directamente a la cantidad del sustrato, aunque sigue aumentando la velocidad, lo que corresponde con una reacción de orden mixto. A elevadas concentraciones de sustrato, la velocidad de la reacción enzimática ya no aumenta más, por más sustrato que se le adicione, indicando una saturación de la enzima con su sustrato y siendo una reacción de orden cero.

Existen factores que pueden afectar la velocidad de una reacción enzimática; entre ellos tenemos la concentración de enzima, la concentración de sustrato, el pH, la temperatura, fuerza iónica (concentración y carga de iones) y presencia de inhibidores (sustancias que disminuyen, o incluso anulan, la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas) (Grajales,2005).

Las enzimas proteolíticas cortan o hidrolizan el enlace peptídico, liberando polipéptidos más sencillos cuando actúan en el interior de las cadenas (endoproteasas) e incluso también aminoácidos elementales cuando lo hacen en la parte exterior (exoproteasas) (Hidalgo, 2011). Es decir, la proteasa rompe el enlace peptídico, liberando el grupo amino y el grupo carboxilo (Guadix *et al.*, 2000).

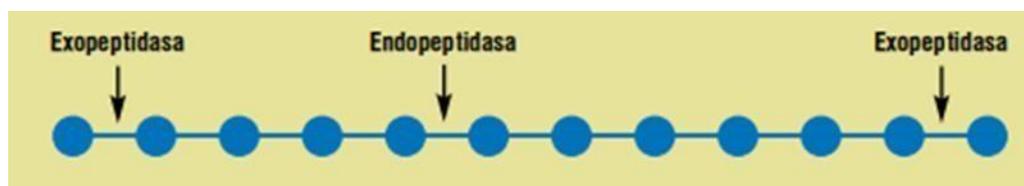
Guadix *et al.* (2000) clasifica a las proteasas según:

- Su origen: animal, vegetal, bacteriano o fúngico.
- La naturaleza del sitio catalítico: las endopeptidasas pueden ser serina-, cisteína-, metalo-, o aspartato-proteinasas y las exopeptidasas amino-, carboxi- o dipeptidasas.
- Su acción catalítica: en endopeptidasas y exopeptidasas.

Las endoproteasas hidrolizan enlaces amídicos al medio de la cadena de la proteína, y las exoproteasas, cortan aminoácidos terminales de las proteínas o péptidos tal y como se muestra en la Figura 2 (Benítez *et al.*, 2008).

Figura 2

Forma de acción de las endoproteasas y exoproteasas



Nota: Obtenido de Vioque *et al.*, (2005)

Las primeras enzimas proteolíticas utilizadas en la industria alimentaria fueron proteasas pancreáticas de origen animal; sin embargo, las de origen bacteriano o fúngico está alcanzando mayor valor (Guadix *et al.*, 2000).

En la Figura 3 se muestra un listado de las proteasas comerciales de grado alimentario; de acuerdo a su fuente, tipo, nombre comercial, rango de pH y la especificidad de la proteasa (Nielsen, 2009).

Figura 3*Proteasas comerciales en hidrolizados de proteínas*

Fuente	Tipo	Nombre/Nombre comercial	Rango pH	Especificidad
Páncreas de cerdo	Serina	Tripsina, PTN	7 – 9	Lys, Arg
Páncreas de cerdo	Serina	Quimotripsina	7 – 9	Phe, Tyr, Trp
Páncreas de cerdo	Aspartato	Pepsina	1 – 4	Leu, Asp, Glu, Aromáticos a.a.
Estómago de becerro	Aspartato	Quimosina, cuajo	3 – 6	Phe-Met en k- caseína
Papaya	Cisteína	Papaína	5 – 9	Amplio
Piña	Cisteína	Bromelina	5 – 8	Lys, Arg, Phe, Tyr
Higo	Cisteína	Ficin	5 – 8	Phe, Tyr, Trp
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Metalo	Neutrasc®	6 – 8	Amplio
<i>B. subtilis</i>	Serina	Subtilisina	6 – 10	Amplio
<i>B. licheniformis</i>	Serina	Alcalasc®	6 – 10	Amplio
<i>B. licheniformis</i> y <i>B. amyloliquefaciens</i>	Serina y metalo	Protamex®	5 – 11	Amplio
<i>B. stearothermophilus</i>	-	Proteasa S	7 – 9	Amplio
<i>B. licheniformis</i>	Serina	Glu-specific	7 – 9	Glu
<i>Aspergillus oryzae</i>	Aminopeptidasa Carboxipeptidasa	Flavourzyme®	5 – 8	Amplio
<i>Aspergillus niger</i>	Aspartato	Proteasa ácida A	2 – 3.5	-
<i>Mucor miehei</i>	Aspartato	Rennilase®	3 – 6	Más amplio que quimotripsina
<i>Fusarium</i>	Aspartato y lisina	Específico	6 – 8	Asp, Lys
<i>Rhizopus</i> sp.	Aspartato	Sumizyme RP	3 – 5	Como pepsina

Nota: Obtenido de Nielsen (2009)

2.4. Hidrólisis

De acuerdo con Flores *et al.* (2008) la hidrólisis es la ruptura de un enlace por la intervención de la molécula de agua (H^+ y OH^-) y como productos se obtiene la formación de un nuevo enlace covalente entre el radical (OH^-) del agua con un grupo que se forma de la ruptura del enlace.

2.4.1. Hidrólisis enzimática de proteínas

La hidrólisis enzimática de proteínas es la unión de una enzima y un sustrato (macromolécula proteica), formando ruptura de enlaces peptídicos, este rompimiento causa péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres (Lahl *et al.*, 1989). La hidrólisis se realiza a través de tres reacciones sucesivas, iniciando formando un complejo enzima-sustrato, luego la rotura del enlace amídico y en efecto la liberación de un péptido. Por último, el péptido sobrante se disocia de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua (Figura 4) (Benítez *et al.*, 2008).

Figura 4

Mecanismo catalítico de una proteasa



Nota: Obtenido de Benítez *et al.* (2008)

Donde:

E: Enzima

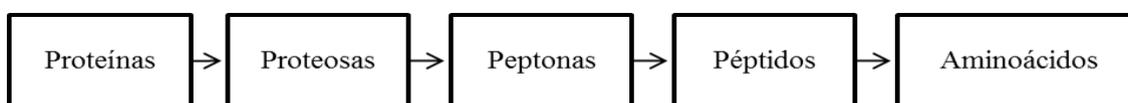
S: sustrato

P, P': péptidos resultantes

Guadix *et al.* (2000) mencionan que, la hidrólisis enzimática de proteínas comprende una serie de etapas secuenciales desde proteína hasta aminoácidos tal cual se muestra en la Figura 5.

Figura 5

Etapas en la hidrólisis enzimática de proteínas



Nota: Obtenido de Guadix *et al.* (2000)

Las especies intermedias como proteosas, peptonas y péptidos difieren en diversas propiedades como solubilidad, tamaños moleculares medios (MW) y la relación nitrógeno amino/nitrógeno total (AN/TN) (Guadix *et al.*, 2000).

2.5. Grado de Hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) es la propiedad esencial de un hidrolizado que es definido como la cantidad de enlaces peptídicos degradados en relación con la proteína original expresado en porcentaje. El GH depende de la concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, el tiempo de incubación, pH, la temperatura y la naturaleza de la enzima (actividad específica y tipo de actividad) (Benítez *et al.*, 2008).

2.5.1. Clasificación de los hidrolizados

Vioque *et al.* (2005) clasifican los hidrolizados en tres grupos de acuerdo al uso alimenticio: los limitados o de bajo grado de hidrólisis (1 -10%), los de grado de hidrólisis variables y los extensivos o de alto grado de hidrólisis (>10%).

- Hidrolizado limitado con bajo grado de hidrólisis (1-10%): Este grupo se caracteriza por mejorar las propiedades tecnofuncionales o tecnológicas, ya que como presenta una disminución del tamaño de los péptidos y el incremento de grupos polares como NH_4 y COO^- , estos factores incrementan la solubilidad, poder emulsificante, espumante o absorción de agua o aceite. Además, la exposición de subproductos hidrófobos de la proteína que están inmersos en el interior de la proteína intacta va a influir en la funcionalidad de los hidrolizados.

- Hidrolizado variable: Este grupo se caracteriza para mejorar el sabor, esto va a depender de la cantidad y tipo de péptidos o aminoácidos liberados, probablemente el factor principal para determinar el sabor es la interacción de estos aminoácidos o pequeños péptidos con otros componentes como azúcares o lípidos.
- Hidrolizado extensivo con alto grado de hidrólisis (>10%): Este grupo se caracteriza por su uso en alimentación especializada, podrían dividirse en suplemento proteico en la dieta e hidrolizados con una composición definida para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos. Además, destaca la buena digestibilidad y absorción intestinal de los hidrolizados extensivos.

2.6. Propiedades funcionales de los hidrolizados

Las propiedades funcionales son afectadas por las variaciones moleculares, y se dividen en dos grupos como las tecno-funcionales y las bio-funcionales. La primera abarca la solubilidad, la emulsión, la espuma y el gusto; mientras que, en la segunda se distribuye en nutricional, digestibilidad, hipoalergenicidad, actividad antimicrobiana, fisiológica, bioactividad, inhibición ACE (enzima convertidora de angiotensina) y biodisponibilidad (Tabla 1) (Mahmoud, 1994)

Tabla 1

Propiedades funcionales de los hidrolizados proteicos

Tecno-funcionales	Bio-funcionales	
Solubilidad	Nutricional	Fisiológica
Emulsión	Digestibilidad	Bioactividad
Espuma	Hipoalergenicidad	Inhibición ACE
Gusto	Actividad antimicrobiana	Biodisponibilidad

Nota: Obtenido de Benítez *et al.* (2008)

2.6.1. Propiedades biofuncionales

Las propiedades biofuncionales se basan en la capacidad de los componentes bioactivos para interactuar con los sistemas biológicos del cuerpo humano y ejercer efectos fisiológicos específicos que se mencionan en la Tabla 1. Se trata de una amplia variedad de componentes bioactivos, como vitaminas, minerales, fibra dietética, ácidos grasos omega-3, antioxidantes como los polifenoles, compuestos fitoquímicos como los carotenoides y flavonoides, probióticos, prebióticos, entre otros. Estos componentes bioactivos pueden provenir de fuentes vegetales, animales o microbianas, y su presencia en los alimentos puede ser natural o puede ser resultado de técnicas de modificación o enriquecimiento durante la producción alimentaria (Coral *et al.*, 2012).

2.6.2. Alimentos funcionales

Hay diferentes interpretaciones del término "alimento funcional", pero en términos generales, se refiere a cualquier tipo de alimento que, además de tener un valor nutritivo, contiene componentes biológicamente activos que proporcionan efectos beneficiosos para la salud y reducen el riesgo de ciertas enfermedades. En la práctica, esto significa que los alimentos funcionales pueden ser naturales o pueden haber sido modificados al añadir, aumentar o eliminar componentes, o al alterar la naturaleza o biodisponibilidad de sus componentes, o cualquier combinación de estas opciones (De Heredia, 2016).

2.7. Radicales libres

Los radicales libres presentan una categoría química que pueden existir en forma independiente y posee uno o más electrones desapareados en su estructura, por ende, son altamente reactivos; además, son especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS) (Rivas *et al.*, 2016).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) consiste en un grupo de moléculas compuesto de oxígeno con diferente reactividad química como el superóxido y el peróxido de hidrógeno, se les considera como metabolitos del oxígeno parcialmente reducidos que poseen una fuerte capacidad oxidante; mientras que las especies reactivas de nitrógeno (RNS) consiste en un

grupo de moléculas conteniendo nitrógeno con diferente reactividad química como el óxido nítrico y el peroxinitrito, donde presentan un electrón desapareado, por lo cual pertenece al grupo de los radicales libres (Carvajal, 2019).

También indican que, los radicales libres a bajas concentraciones son vitales para el buen funcionamiento celular y podrían actuar como segundos mensajeros estimulando la proliferación celular y/o actuando como intermedios para la activación de las células; por otro lado, a altas concentraciones, podría almacenarse hasta niveles tóxicos y como consecuencia producir diversas acciones sobre el metabolismo primario, que podrían resultar daño oxidativo de macromoléculas biológicas (ADN, lípidos, carbohidratos y proteínas) (Rivas *et al.*, 2016).

Coronado *et al.* (2015) indican que, los radicales se liberan en el metabolismo del hombre, y se producen por contaminantes ambientales (atmosféricos, acuáticos, de suelos), radiaciones (ultravioleta, gamma, hertziana), entre otros. Además, se podría referir al consumo o uso de tóxicos como el alcohol, tabaco y drogas o a una alimentación no adecuada, exposición a fertilizantes o pesticidas. Seguidamente, en el metabolismo de algunos químicos y alto estrés físico o mental.

2.8. Antioxidantes

Los antioxidantes son bioactivos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas invalidando el comienzo y/o difusión de las reacciones en cadena de los radicales libres (Rivas *et al.*, 2016).

Además, Zamora (2007) menciona que, los antioxidantes pueden dividirse en:

- Enzimáticos (endógenos): Son aquellos que requieren apoyo externo y por ello se recomiendan los antioxidantes exógenos (Coronado *et al.*, 2015). Los más representativos son: Superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y glutatión reductasa (Mariaca *et al.*, 2016).

- No enzimáticos (exógenos): son aquellos que pueden formar parte de la dieta diaria (Coronado *et al.*, 2015). Los más representativos son ácido ascórbico, glutatión, cisteína, ácido lipoico, ácido úrico, tocoferol, ubiquinol, retinoides y carotenos (Mariaca *et al.*, 2016).

De acuerdo con Brito (2016), según la función de cómo interaccionan con los agentes oxidantes, los antioxidantes pueden ser:

- Antioxidantes primarios: impiden la formación de radicales libres, especialmente las ROS (Reactive Oxygen Species).
- Antioxidantes secundarios: interrumpen la propagación de radicales libres o desplazan las ROS, inhibiendo la generación de estas especies, e impidiendo la activación metabólica de carcinógenos.
- Antioxidantes terciarios: reparan el daño causado por los radicales libres o eliminan moléculas que se han estropeado, modificando el potencial redox mejorando, por ejemplo, la reparación del ADN.

2.9. Mecanismo de los antioxidantes

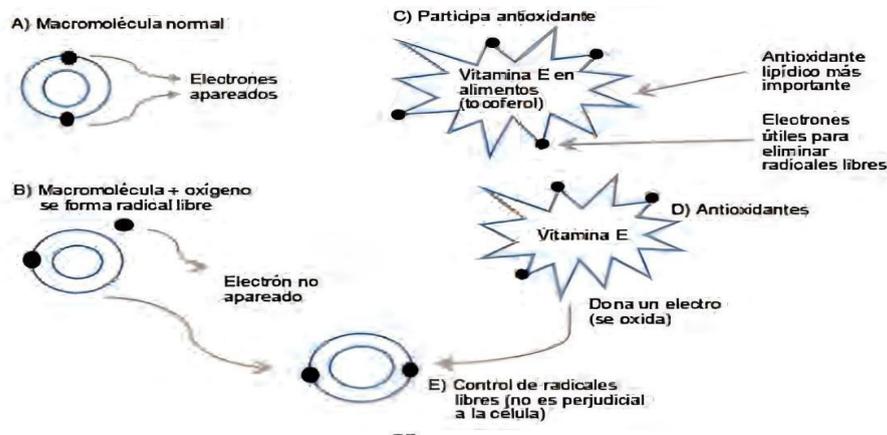
El estrés oxidativo está vinculado a las células y el acto de cómo es afectado los radicales libres, en un equilibrio entre los radicales u otras especies reactivas con los mecanismos antioxidantes (exógeno y endógeno), esto permite que haya una baja toxicidad por oxidación, pero cuando presenta una ruptura en el equilibrio se podría relacionar con el déficit en el sistema antioxidante o por el aumento descontrolado de los radicales libres, a ese hecho nombramos estrés oxidativo (Coronado *et al.*, 2015).

En el organismo, el oxígeno procede como carburante en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas; liberándose dióxido de carbono, agua, energía calórica y diversos catabolitos; no obstante, el incremento de los procesos metabólicos también

producirá radicales libres. Por lo tanto, gracias a los antioxidantes, evita la oxidación de sustancias que pueden ocasionar alteración fisiológica, facilita el manejo fisiológico del oxígeno (mitocondrias) y así ayudando los efectos del estrés oxidativo y la deficiencia del oxígeno (Figura 6) (Zamora, 2007).

Figura 6

Interacción entre radicales libres y antioxidantes



Nota: Obtenido de Coronado et al. (2015)

2.1. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante total se define como el potencial de una sustancia o compuesto para inhibir o dificultar la oxidación de un sustrato hasta en cantidades muy pequeñas (< 1%, comúnmente 1-1,000 mg/L). Su medición es útil para valorar la calidad de un alimento, la cantidad de antioxidantes en un sistema, o la biodisponibilidad de compuestos antioxidantes en el cuerpo humano (López *et al.*, 2013).

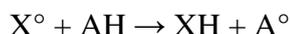
2.1.1. Mecanismos de reacción

Los antioxidantes pueden neutralizar los radicales libre a través de dos vías principales:

- HAT (Hydrogen Atom Transfer), son reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno; es decir, se inactiva el radical por donación de un átomo de hidrógeno por parte del antioxidante. Donde X[•] es el radical libre y AH, el antioxidante. (Figura 7).

Figura 7

Reacción de transferencia de átomos de hidrógeno

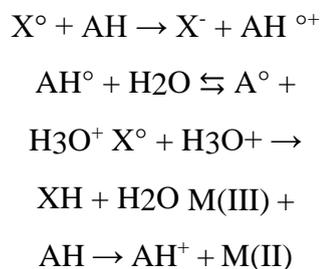


Nota: Obtenido de Prior *et al.* (2005)

- SET (Single Electron Transfer), son reacciones de transferencia de un electrón para reducir cualquier compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales. Donde X. es el radical libre y AH, el antioxidante. (Figura 8).

Figura 8

Reacción de transferencia de un electrón



Nota: Obtenido de Prior *et al.* (2005)

Seguidamente, se explica brevemente algunos de los principales métodos para la determinación de la capacidad antioxidante.

- Métodos ABTS (azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico): El ABTS^{•+} permite analizar compuestos hidrofílicos y lipofílicos, ya que el ABTS^{•+} es soluble en medio acuoso y orgánico; también, el ABTS debe ser producido por medio de una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidase, mioglobulina), o también electroquímica. Los resultados son expresados como equivalentes de Trolox o TEAC (por su nombre en inglés, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Kuskoski, 2005). El trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman- 2-carboxylic acid) es un análogo de la vitamina E (Muñoz *et al.*, 2007).

- Método DPPH ((Difenil Picril Hidrazilo): El DPPH permite analizar compuestos que pueden disolverse en medio orgánico; también, el DPPH es un radical libre que puede producirse directamente sin una preparación previa (Kuskoski *et al.*, 2005). El DPPH^{*} es una fuerte coloración violeta y comercializado, se fundamenta en el cálculo de la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical DPPH^{*}, esta medición puede hacerse espectrofotométricamente siguiendo el declive de la absorbancia a 517 nm (Londoño, 20102).
- Método TRAP (Parámetro Antioxidante Total de Atrapamiento de Radicales): Está basado en un estrés oxidativo no fisiológico (radicales peroxilo solubles en agua) (Pisoschi *et al.*, 2011). Se fundamenta en calcular la inhibición de la oxidación inducida por radicales peroxilo. Se utilizan radicales peroxilo (descomposición térmica de un compuesto hidrosoluble), luego añadida la muestra, se controla la oxidación a través del oxígeno consumido. El tiempo en el que se inhibe la oxidación de los antioxidantes en la muestra, se compara con el trolox (Reguillo, 2018).
- Método FRAP (Actividad reductora del hierro férrico/poder antioxidante): Se fundamenta en la reducción tripiridiltriazina férrica (Fe⁺³) por los antioxidantes a tripiridiltriazina ferrosa (Fe⁺²), este producto es de color azul. También, presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 593 nm (Benzie *et al.*, 1996).
- Método ORAC (Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno): Permite calcular la disminución en la fluorescencia de una proteína como resultado de la pérdida de su conformación cuando sufre daño oxidativo causando por una fuente de radicales peróxidos (ROO). El método evalúa la capacidad de los antioxidantes en la muestra para proteger la proteína del daño oxidativo (Rivas *et al.*, 2016).
- Método DMPD (N, N-dimetil-p-fenilendiamina): Permite analizar compuestos no lipídicos. Se fundamenta en añadir 1 mL de la disolución de DMPD 100 mM a 100 mL de disolución tamponada con ácido acético/ acetato de sodio 0,1 M (pH 5,25). Tras la adición de 0,2 mL de una disolución de cloruro férrico 0,05 M (concentración final de 0,1 mM) se forman radicales cationes coloreados (DMPD^{*}). Un mililitro de esta disolución se traslada a una cubeta midiéndose su absorbancia, comprendida entre 0,90

($\pm 0,1$), a 506 nm. Se añade 50 μL de una disolución patrón de antioxidante o de muestras diluidas y transcurridos diez minutos (a 25°C) se hace otra medida de absorbancia a 506 nm. La disolución tamponada de acetato se utiliza como blanco de referencia. Los resultados se expresan en TEAC (en mM o μM) o en VCEAC, actividad equivalente a vitamina C (mg/L o mg/100 g) (Fogliano *et al.*, 1999).

En la Tabla 2 se presentan los métodos para determinar la capacidad antioxidante basada en la instrumentación requerida, la relevancia biológica, el mecanismo antioxidante, el punto final, el método de cuantificación y la adaptabilidad para medir antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos (Prior *et al.*, 2005).

El trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) es un fármaco antioxidante similar a la vitamina E, y se utiliza para reducir el estrés oxidativo o restaurar el daño causado por éste, así evitando enfermedades cardíacas, la anemia, la inflamación y los trastornos neurodegenerativos. Asimismo, se aplica como un antioxidante estándar en ensayos experimentales como el ABTS, DPPH y ORAC. Por ende, usan la capacidad antioxidante equivalente de trolox, y se emplea para medir la capacidad antioxidante de otras sustancias en comparación con el compuesto estándar trolox. Por ejemplo, en el ensayo ABTS, menciona que compara la capacidad del trolox y otras moléculas para eliminar el catión radical estable $\text{ABTS}^{\cdot+}$ + (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) mediante la reducción de un electrón o mediante la extinción de radicales actividades a través de la donación de átomo de hidrógeno (De Oliveira *et al.*, 2020 & Cano *et al.*, 2017).

Tabla 2*Comparación de métodos para medir capacidad antioxidante*

Método	Instrumentación (a)	Relevancia biológica (b)	Mecanismo (c)	Punto final	Cuantificación (d)	Lipófilos-hidrófilos (e)
CARO	-	+++	HAT	Tiempo	ABC	+++
TRAP	++	+++	HAT	Fase de inducción	CE50. Fase de inducción	--
FRAP	---	--	SET	Tiempo	Absorbancia	---
ABTS	-	-	SET-HAT	Tiempo	Absorbancia	+++
DPPH	-	-	SET-HAT	Tiempo	Absorbancia	-

Nota: a.De la más (+++) a la menos (---) especializada; b.Del más (+++) al menos (---) relevante; c.HAT: Transferencia de Átomos de Hidrógeno, SET: Transferencia de Electrones; d.ABC: Área Bajo la Curva, CE50: Concentración efectiva 50; e.Del más (+++) al menos (---) adaptable. Tomado de Prior *et al.*, (2005)

III. METODOLOGÍA

3.1. Lugar de ejecución

La presente investigación se realizó en los Laboratorios de Ingeniería y de Procesamiento de Recursos Hidrobiológicos de la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2. Materia Prima

Se utilizaron subproductos de trucha como esquelones, pieles, aletas y vísceras que se obtuvieron de la empresa COMPESCA SEAFOOD E.I.R.L. que trabaja en el terminal Pesquero SERINPES S.A. de Villa María del Triunfo.

3.3. Materiales, equipos y reactivos

3.3.1. Materiales

- Matraces (100, 250 mL)
- Tubos de ensayo (12 x 75 mm)
- Pipetas (10 mL)
- Fiola (10, 50, 100 mL)
- Bagueta
- Piceta
- Luna de reloj
- Micropipeta (20 - 200 μ L, 100 - 1000 μ L)

- Beakers (50, 100, 250 mL)
- Frascos Ámbar (50 mL, 1000 mL)
- Frascos de vidrio
- Tips para micropipeta (20 - 200 μ L, 100 - 1000 μ L)
- Tubos para centrífuga (15 mL, 50 mL)
- Bolsas de polipropileno
- Colador
- Jeringa (1 mL)
- Baldes transparentes graduado
- Bandejas de plástico 25,4 x 29,5cm
- Tabla de picar 26 x 41cm
- Cuchillos inoxidable
- Papel filtro (que numero de papel filtro)
- Papel film U-THIL 15m

3.3.2. Equipos

- Centrifuga refrigerada (HETTICH, modelo Rotofix 32, Alemania)
- Espectrofotómetro UV/Vis (THERMO SCIENTIFIC, Genesys 10 UV, USA)
- Potenciómetro (0-14) (THERMO ORION, modelo 410, USA)
- Balanza de precisión (OHAUS, modelo Scout, China)
- Balanza analítica (OHAUS, modelo AR2 140, USA)
- Agitador Vórtex (VELP Scientific, modelo F202A0175, Europa)
- Agitador magnético (CAT, Modelo M6, Alemania)
- Baño María con agitación (GFL, modelo 1083, Alemania).

- Termómetro (HANNA, Italia)
- Moledora de carne (BERKEL, USA)
- Refrigerador (LG, modelo GR-482 BEF, Corea)
- Estufa (MERMERT W854, Alemania)
- Mufla (NABERTHERM, Alemania)
- Termómetro (HANNA, Italia)
- Moledora de carne (BERKEL, USA)
- Estufa (MERMERT W854, Alemania)
- Mufla (NABERTHERM, Alemania)

3.3.3. Reactivos

- 2,2 difenil-1-hidrocilo (DPPH) (Sigma-Aldrich, USA)
- 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) ABTS (Sigma-Aldrich, USA)
- Persulfato de sodio (Na₂ S₂ O₈) (CDH MICROGEN, INDIA)
- Etanol (C₂ H₅ OH) (SIGALD, USA)
- Metanol 80% (SIGALD, USA)
- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman- 2-carboxylic acid) (Millipore, USA)
- 2,4-Dinitrofluorobenceno (DNFB) (Sigma-Aldrich, USA)
- Tetraborato de sodio (Sigma-Aldrich, USA)
- Enzima Protamex (Sigma, USA)
- Enzima Flavourzyme (Sigma, USA)
- Glicina (C₂H₅NO₂) (Sigma, USA)
- Ácido clorhídrico (HCl) (SIGALD, USA)
- Ácido sulfúrico (H₂ SO₄) (Sigma-Aldrich, USA)

- Agua destilada

3.4. Métodos de análisis

3.4.1. Análisis físico-químico

a. Determinación de contenido de humedad:

Se determinó de acuerdo con el método propuesto por la FAO (1986), Food and Nutrition Paper pp. 205 T 14/7, 1986. El resultado se expresó en porcentaje.

b. Determinación del contenido de proteína total:

Se determinó de acuerdo con el método propuesto por la FAO (1986), Food and Nutrición Paper pp. 221 T 14/7. El resultado se expresó en porcentaje.

c. Determinación de grasa:

Se determinó de acuerdo con el método propuesto por FAO (1986), Food and Nutrición Paper pp. 212 T 14/7. El resultado se expresó en porcentaje.

d. Determinación de ceniza:

Se determinó de acuerdo con el método propuesto por la FAO (1986), Food and Nutrition Paper pp 228 T 14/7, 1986. El resultado se expresó en porcentaje.

3.4.2. Determinación del grado de hidrólisis

Para la determinación del grado de hidrólisis se utilizaron los siguientes procedimientos.

a. Determinación del contenido de nitrógeno total:

Se aplicó el método propuesto por el ITP (2004) con algunas modificaciones. Se pesó 1 gr de muestra y fue colocado en un frasco, luego se añadió 25 ml de H₂SO₄ 7 N, seguidamente se llevó a una temperatura de 103 °C por un tiempo de 24 horas, después del tiempo determinado, se procedió a enfriar, posteriormente se colocó en una fiola de 100 mL y se enraso con agua destilada. Finalmente se diluyó, se tomó una alícuota de 1mL y se agregó en un tubo de ensayo.

b. Determinación del contenido de nitrógeno amínico

Se aplicó el método de Dumay *et al.* (2004). En los tubos de ensayos preparados con 1 mL de la muestra, se colocó 1 mL de tetraborato de sodio al 2 % (v/v). Seguidamente se adicionó 0,25 mL de la solución de 2,4- dinitrofluorobenceno (DNFB al 1,3 % en etanol) y se mezcló en el vortex, después se calentó al baño maría a 60 °C por 10 minutos, luego se enfrió y se colocó 2 mL de ácido clorhídrico 6 N con el fin de detener la reacción. En la cuantificación se utilizó un espectrofotómetro en el cual se midió la absorbancia de la reacción a una longitud de onda de 410 nm. Los resultados se expresaron en equivalentes de glicina.

Simultáneamente, se realizó la curva de calibración, donde se utilizó como patrón la glicina con una concentración de 0,15 µg/µL a partir del cual se prepararon soluciones con las siguientes concentraciones: 3,75; 7,5; 15; 37,5 y 75 µg/mL, y se colocó en un tubo de ensayo y se completó con agua destilada a 1mL. El resultado se expresó como porcentaje de grado de hidrólisis. (Ec. 1)

$$\%GH = (\text{Equivalente de glicina después de la hidrólisis enzimática} / \text{Equivalente de glicina en la muestra después de la hidrólisis ácida}) \times 100 \dots\dots\dots\text{Ec. 1}$$

3.4.3. Métodos para determinar la capacidad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante se utilizaron los siguientes métodos:

a. Método ABTS

Para la determinación de la capacidad antioxidantes por el método ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) se siguió la metodología propuesta por Arnao et al. (2001) con algunas modificaciones. Se preparó una solución ABTS•+, diluyendo 7,84 mg/mL de ABTS y 1,32 mg/mL de persulfato de potasio en agua destilada, se tomó volúmenes iguales de cada solución, se dejó reaccionar durante 12 horas a temperatura ambiente y en oscuridad, luego se precedió en diluirlo con metanol al 80 % hasta llegar a una absorbancia de 1,1 (± 0,02) con una longitud de onda de 734 nm; seguidamente se colocó en el tubo de ensayo 150 µL de la muestra, solución estándar o blanco y 2850 µL de la dilución del ABTS en metanol. Finalmente, la reacción transcurre por 30 min a oscuridad y se tomaron las lecturas a una absorbancia a 734nm.

Simultáneamente, se realizó la curva de calibración, donde se utilizó como patrón el trolox con una concentración de 1000 µmol/L a partir del cual se prepararon soluciones con las siguientes concentraciones: 100, 200, 300, 400, 500 µM, se colocaron en tubos de ensayo y se completó con metanol 150 µl al 80 %.

El resultado se expresó como porcentaje de inhibición del efecto antioxidante sobre le ABTS•+. (Ec. 2)

$$\% \text{Inhibición} = ((A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{control}}) \times 100 \dots\dots\dots \text{Ec. 2}$$

Donde:

Acontrol: Absorbancia del control

Amuestra: Absorbancia de la muestra

b. Método DPPH

Para la determinación de la capacidad antioxidante por el método del atrapamiento del radical libre DPPH (2,2 difenil-1-hidracilo) se siguió lo propuesto por Brand-Williams et al. (1995) con algunas modificaciones. Se preparó una solución de DPPH, se pesó 2,3 mg de DPPH y se disolvió en 100 mL de metanol puro a temperatura ambiente y en oscuridad.

Seguidamente, se colocó en el tubo de ensayo 2,9 mL de la solución y se midió la absorbancia a tiempo cero con una longitud de onda de 515 nm, luego se adicionó 100 μ L de la muestra o solución estándar. Finalmente, la reacción transcurre por 60 min a oscuridad y se tomaron las lecturas a una absorbancia a 515 nm.

Simultáneamente, se realizó la curva de calibración, donde se utilizó como patrón el trolox con una concentración de 2 mM a partir del cual se prepararon soluciones con las siguientes concentraciones: 50, 100, 500 y 1000 μ M, y se colocó en un tubo de ensayo y se completó con metanol a 100 μ L.

El resultado se expresó como porcentaje de inhibición de DPPH utilizando la siguiente expresión. (Ec. 3)

$$\% \text{Inhibición} = ((A_0 - A_f) / A_0) \times 100 \dots\dots\dots \text{Ec. 3}$$

Donde:

A₀: Absorbancia inicial del DPPH

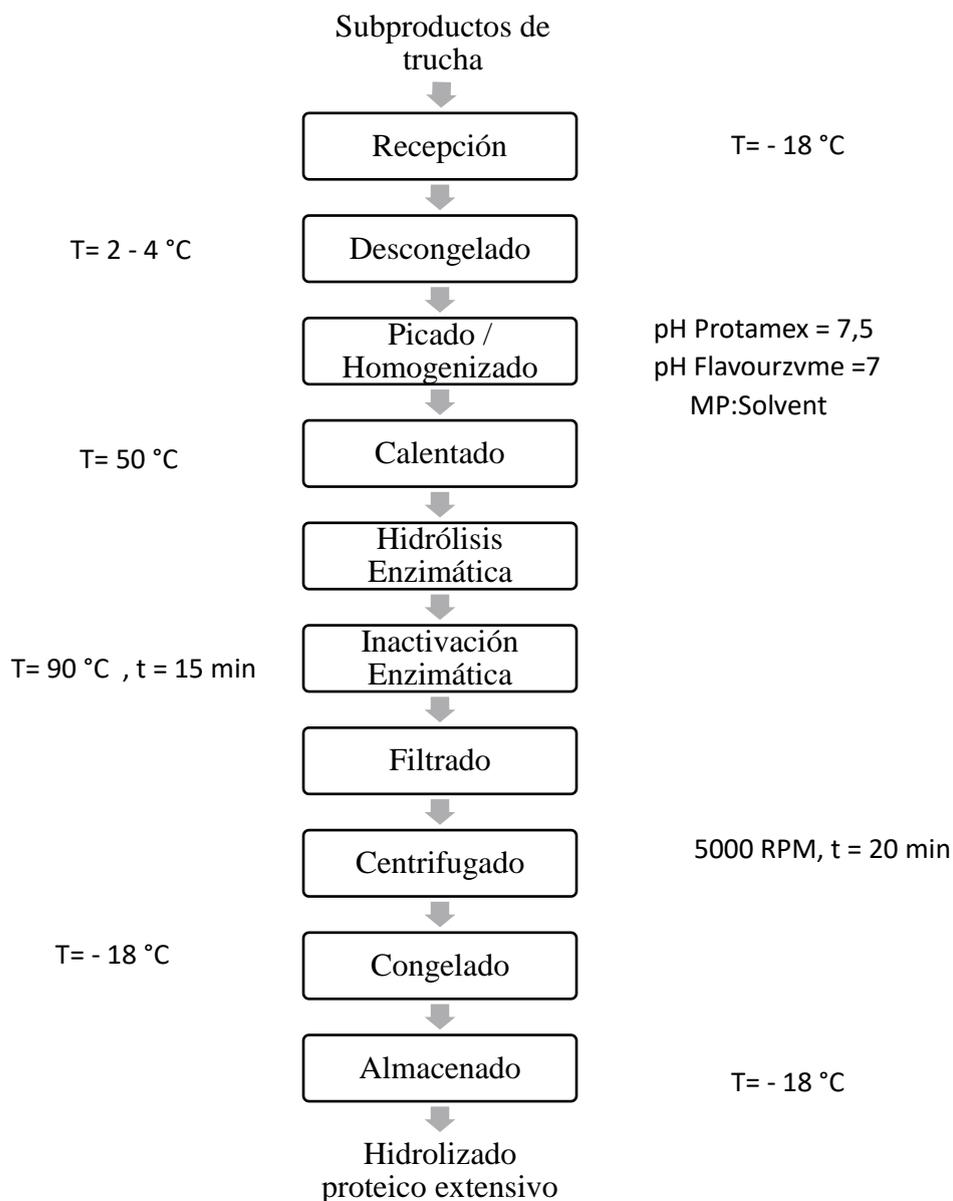
A_f: Absorbancia final del DPPH después de 60 min

3.5. Metodología procedimental

El proceso de obtención del hidrolizado proteico a partir de subproductos de trucha se realizó siguiendo el procedimiento propuesto por (López *et al.*, 1977) con ligeras pequeñas modificaciones como la temperatura de la etapa de calentamiento, tiempo y temperatura de inactivación enzimática además se eliminó la etapa de desecación (atomización) (Figura 9).

Figura 9

Flujograma para la obtención del hidrolizado proteico enzimático extensivo a partir de los subproductos de la trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss)



Nota: Tomado de López *et al.* (1977)

Descripción de procedimiento experimental

a. Recepción

Los subproductos de trucha (esquelones, pieles, aletas y vísceras) se recibieron congelados en cajas de poliestireno a una temperatura de -18 °C.

b. Descongelado

Los subproductos se descongelaron a temperatura de refrigeración hasta una temperatura de 2 – 4 °C con la finalidad de no romper la cadena de frío. Se realizó el análisis sensorial de acuerdo con la tabla propuesta (Tabla 3).

c. Picado/Homogenizado

Los subproductos se trituraron en una moledora, luego se vertió en vasos precipitados con agua destilada, se homogenizó y se procedió a realizar el ajuste de pH de acuerdo a la enzima: Protamex 7,5 y Flavourzyme 7.

d. Calentado

Una vez picado y homogenizado se calentó a una temperatura de 50 °C con agitación manual en el baño maría con la finalidad de dar las condiciones para iniciar la hidrólisis enzimática.

e. Hidrólisis enzimática

Se llevó a cabo en función de las pruebas obtenidas de diseño experimental en donde mezcló la masa homogenizada con las enzimas.

f. Inactivación de la enzima

Se procedió a su inactivación llevando la muestra a una temperatura de 90°C por un tiempo de 15 minutos.

g. Filtrado

Seguidamente se utilizó el colador para separar los sólidos de la parte soluble; es decir, aquellos que no fueron hidrolizados por acción de la enzima.

h. Centrifugado

Posteriormente se colocó en la centrífuga a 5000 RPM por 20 minutos con el objetivo de separar el material soluble del insoluble.

i. Congelado y almacenado

La fracción soluble se extrajo y se colocó en tubos falcon y se llevó a congelación para su posterior análisis

3.6. Diseño experimental y Análisis estadístico

Se utilizó el procedimiento de optimización a través de la metodología de superficie de respuesta a través de un diseño de experimentos Box Behnken para cada enzima, las variables independientes para el estudio fueron porcentaje de enzima, tiempo, y relación MP:solvente (Tabla 3), y como variable respuesta se establecieron el grado de hidrólisis, utilizando el programa Minitab.

Tabla 3

Factores y niveles para la obtención de hidrolizados a partir de los subproductos de la trucha arcoíris

Factores	Niveles		
	-1	0	1
% Enzima	0,5	1,25	2
Tiempo (min)	60	120	180
Relación MP: solvente (g trucha/ml H ₂ O)	0,5	1	1,5

El trabajo se desarrolló en dos experimentos:

Primer experimento: Optimización del proceso de hidrólisis enzimática extensiva y determinación de la capacidad antioxidante utilizando la enzima Protamex

Se utilizó la enzima Protamex, para ello se combinaron diferentes porcentajes de enzima (0,5; 1,25 y 2 %), tiempos (60, 120 y 180 min) y relación de MP:solvente (0,5:1; 1:1 y 1,5:1) de acuerdo al diseño Box Behnken (Tabla 4).

Tabla 4

Diseño experimental de Box Behnken con sus variables independientes (%enzima, MP:solvente y tiempo) de la enzima Protamex

Orden	%Enzima	Tiempo	Relación MP:Solvente
1	0,5 (-1)	60 (-1)	1 (0)
2	2 (1)	60 (-1)	1 (0)
3	0,5 (1)	180 (1)	1 (0)
4	2 (1)	180 (1)	1 (0)
5	0,5 (-1)	120 (0)	0,5
6	2 (1)	120 (0)	0,5 (-1)
7	0,5 (-1)	120 (0)	1,5 (1)
8	2 (1)	120 (0)	1,5 (1)
9	1,25 (0)	60 (-1)	0,5 (-1)
10	1,25 (0)	180 (1)	0,5 (-1)
11	1,25 (0)	60 (-1)	1,5 (1)
12	1,25 (0)	180 (1)	1,5 (1)
13	1,25 (0)	120 (0)	1 (0)
14	1,25 (0)	120 (0)	1 (0)
15	1,25 (0)	120 (0)	1 (0)

Segundo experimento: Optimización del proceso de hidrólisis enzimática extensiva y determinación de la capacidad antioxidante utilizando la enzima Flavourzyme

Se utilizó la enzima Flavourzyme, para ello se utilizaron diferentes porcentajes de enzima (0,5; 1,25 y 2 %), tiempos (60, 120 y 180 min) y relación de MP:solvente (0,5:1, 1:1 y 1,5:1) de acuerdo al diseño Box Behnken (Tabla 5).

Tabla 5

Diseño experimental de Box Behnken con sus variables independientes (%enzima, MP:solvente y tiempo) de la enzima Flavourzyme

Orden	%Enzima	Tiempo	Relación MP:Solvente
1	0,5 (-1)	60 (-1)	1 (0)
2	2 (1)	60 (-1)	1 (0)
3	0,5 (1)	180 (1)	1 (0)
4	2 (1)	180 (1)	1 (0)
5	0,5 (-1)	120 (0)	0,5
6	2 (1)	120 (0)	0,5 (-1)
7	0,5 (-1)	120 (0)	1,5 (1)
8	2 (1)	120 (0)	1,5 (1)
9	1,25 (0)	60 (-1)	0,5 (-1)
10	1,25 (0)	180 (1)	0,5 (-1)
11	1,25 (0)	60 (-1)	1,5 (1)
12	1,25 (0)	180 (1)	1,5 (1)
13	1,25 (0)	120 (0)	1 (0)
14	1,25 (0)	120 (0)	1 (0)
15	1,25 (0)	120 (0)	1 (0)

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis sensorial

Para evaluar la frescura de los subproductos se propuso una tabla para establecer los criterios de frescura (Tabla 6), a través de la asignación de puntos de acuerdo con los descriptores establecidos y definir la clasificación del estado de frescura (Tabla 7), que permite establecer distintas categorías de grado de frescura mediante la sumatoria de puntos (malo, aceptado, bueno o muy bueno). Estos parámetros fueron evaluados por un sistema de puntuación del 1 al 3, donde se le asigna una puntuación de 1 a los subproductos deteriorados y 3 a los que presentan un nivel alto de frescura.

Tabla 6

*Evaluación sensorial de los subproductos de trucha (*Oncorhynchus mykiss*)*

		Criterios Sensoriales		
		Nivel De Frescura		
		Bueno	Regular	Malo
Color y Aspecto	Ojos	Brillante, reluciente y uniforme. Ojos convexos y salientes. (3 pts.)	Ligera pérdida de brillo, Ojos planos, pupila opaca, ligeramente cóncavos. (2 pts.)	Pérdida de brillo. Ojos con sangre, cóncavos en el centro, pupila gris, cornea lechosa. (1 pt.)
	Piel	Brillante, uniforme y reluciente. Escamas adheridas a la piel. (3 pts.)	Ligera pérdida de brillo. Ligeramente turbia. Algunas escamas en la piel. (2 pts.)	Pérdida de brillo. Pigmentación decolorada, escamas sobresalidas, calidad inferior. (1 pt.)
	Branquias	Rojas Brillante. (3 pts.)	Ligera pérdida de brillo. (2 pts.)	Amarillentas Amarronadas. (1 pt.)

	Viscera	Brillante. Órganos definidos (3 pts.)	Ligera pérdida de Brillo. Órganos poco definidos. (2 pts.)	Pérdida de brillo. Los órganos no tienen definición (1 pt.)
	Olor	Fresco. Olor a agua dulce. (3 pts.)	Neutro. (2 pts.)	Olor a pescado intenso, agrio, ácido, algo descompuesto, pútrido o de calidad inferior. (1 pt.)

Tabla 7

Valoración de los subproductos de la trucha arcoíris

Puntaje	Grado de calidad
14-15	Extra o muy bueno
12-13	Buena
8-11	Aceptable
5-7	Malo

Para analizar el índice de calidad de los subproductos de trucha se utilizó la tabla propuesta en el apartado anterior (Tabla 6), en ella se consideraron los siguientes criterios: ojos, piel, branquias, vísceras y olor.

El resultado obtenido luego de realizar la evaluación fue de 12 puntos (Tabla 8), de acuerdo con los criterios anteriores, la muestra analizada fue catalogada como una materia prima de calidad buena.

Tabla 8*Evaluación sensorial de los subproductos de la trucha arcoíris*

Criterios	Puntaje
Ojos	3
Piel	3
Branquias	2
Vísceras	2
Olor	2
Total	12

4.2. Análisis físico-químico de la Materia Prima

Los resultados obtenidos después de realizar la composición química proximal a los subproductos de la trucha se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9

Composición química proximal de subproductos de la trucha arco iris

Componente	Porcentaje (%)	Porcentaje (%) (Palou, 2011)	Porcentaje (%) (Florez, 2017)
Humedad	66,48	66	62
Grasa	17,72	16,7	24,2
Proteína	12,13	11,3	12,2
Cenizas	3,1	6	1,6

Además, se observa en la Tabla 9, los valores obtenidos que se encuentran dentro del rango reportado por otros investigadores que han trabajado con subproductos de la trucha (Palou, 2011; Florez, 2017).

Por otro lado, hay diferencias en los resultados de la composición química, así como Taheri et al. (2012), que reportó un contenido de 71,65 % humedad, 13 % grasa, 15 % proteínas y 2,73 % de cenizas. Asimismo, He et al. (2011), que determinó un contenido de humedad 61,24 %, proteína de 10,73 %, grasa 27,19 %, y cenizas de 1,3 %. La variación de la composición química proximal podría estar influenciado por el sexo, la edad, la zona de captura y la época del año, así como el estado nutricional y la temperatura del agua, lo cual define el tiempo de cosecha (Chuesiang et al., 2015).

4.3. Proceso de hidrólisis enzimática de subproductos de trucha

4.3.1. Optimización del proceso de hidrólisis enzimática extensiva utilizando la enzima Protamex

Luego de procesar los subproductos de trucha siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.5, se obtuvo el hidrolizado proteico extensivo y sus grados de hidrólisis fueron evaluados después de realizar los diferentes tratamientos como se muestra en la Tabla 10, en ella se evidencia que varía de 40,48 a 52,39 GH (%), siendo el último en mención el mejor resultado obtenido.

Tabla 10

Resultados del proceso de hidrólisis utilizando la enzima Protamex en función de diferentes valores de las variables independientes

Exp	% Enzima X₁	Tiempo X₂	MP:Solvente X₃	GH Protamex (%) X₄
1	0,5 (-1)	60 (-1)	1 (0)	45,78
2	2 (1)	60 (-1)	1 (0)	43,67
3	0,5 (1)	180 (1)	1 (0)	45,42
4	2 (1)	180 (1)	1 (0)	47,34
5	0,5 (-1)	120 (0)	0,5 (-1)	52,39
6	2 (1)	120 (0)	0,5 (-1)	45,71
7	0,5 (-1)	120 (0)	1,5 (1)	42,09

8	2 (1)	120 (0)	1,5 (1)	45,95
9	1,25 (0)	60 (-1)	0,5 (-1)	44,45
11	1,25 (0)	60 (-1)	1,5 (1)	40,48
12	1,25 (0)	180 (1)	1,5 (1)	45,87
13	1,25 (0)	120 (0)	1 (0)	40,97
14	1,25 (0)	120 (0)	1 (0)	40,93
15	1,25 (0)	120 (0)	1 (0)	40,50

La ecuación de regresión polinomial del grado de hidrólisis de la enzima Protamex tiene como finalidad de reiterar el comportamiento de las variables independientes (factores) con respecto a la variable dependiente (grado de hidrólisis).

A continuación, se muestra la ecuación 4 del modelo generado de regresiones significativas para la optimización del grado de hidrólisis utilizando la enzima Protamex.

$$\text{GH Protamex} = 40,801 - 0,374 X_1 + 2,028 X_2 - 2,518 X_3 + 2,796 X_{12} + 1,956 X_{22} + 2,939 X_3^2 + 1,007 X_1X_2 + 2,635 X_1X_3 - 0,533 X_2X_3 \dots\dots\dots\text{Ec. 4}$$

En la Tabla 11 se presenta el análisis de varianza ANVA del modelo ajustado para la respuesta grado de hidrólisis de la enzima Protamex, permite conocer el grado de variación que produce cada factor con respecto al grado de hidrólisis. Se evidencian cinco efectos significativos en el grado de hidrólisis a un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$), siendo los más importante el tiempo, MP:solvente y la interacción enzima*MP:solvente. Por lo contrario, el % enzima no influyó de manera significativa sobre el proceso de hidrólisis ($p > 0,05$), es posible que, debido a las cantidades mínimas utilizadas no sea suficiente para respaldar un impacto significativo.

El coeficiente de determinación (R^2) para el modelo fue de 0,9358 para el grado de hidrólisis de la enzima Protamex, indica que el modelo explica el 93,58% de la variabilidad en la respuesta del grado de hidrólisis; mientras que el R^2 ajustado de 82,01 % se presenta cuando existen diferentes números de variables independientes, este valor permite el uso de dichos modelos en procesos biotecnológicos (Missau et al., 2014).

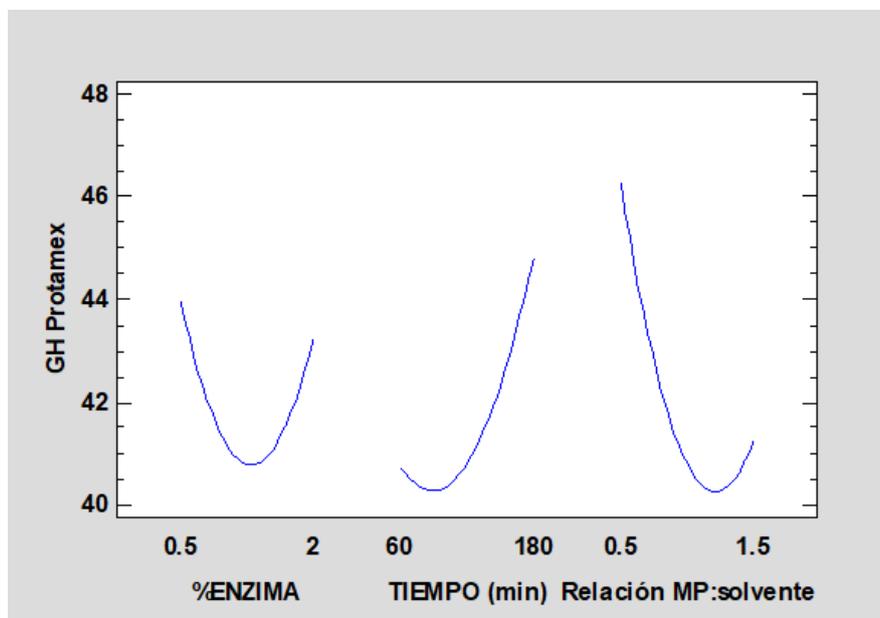
Tabla 11*Análisis de varianza del modelo ajustado para grado de hidrólisis de la enzima Protamex*

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	183,028	20,3364	8,09	0,017
Lineal	3	84,723	28,2409	11,24	0,012
Enzima	1	1,119	1,1186	0,45	0,534
Tiempo	1	32,897	32,8967	13,09	0,015
MP: Solvente	1	50,708	50,7076	20,18	0,006
Cuadrado	3	65,347	21,7823	8,67	0,020
Enzima*Enzima	1	28,857	28,8568	11,48	0,019
Tiempo*Tiempo	1	14,128	14,1279	5,62	0,064
MP:Solvente*MP:Solvente	1	31,895	31,8952	12,69	0,016
Interacción de 2 factores	3	32,958	10,9861	4,37	0,073
Enzima*Tiempo	1	4,055	4,0549	1,61	0,260
Enzima*MP:Solvente	1	27,765	27,7652	11,05	0,021
Tiempo* MP:Solvente	1	1,138	1,1380	0,45	0,531
Error	5	12,567	2,5134		
Error puro	2	0,137	0,0684		
Total	14	195,595			

En la Figura 10, muestra el gráfico de los efectos principales de variables estudiadas y nos proporciona una idea independiente y cualitativa de cada variable estudiada y su efecto sobre la respuesta (grado de hidrólisis), con respecto a la relación MP:solvente presentó un efecto directo con relación a la disminución del grado de hidrólisis, hasta aproximadamente 1,25 g/H₂O lo cual es un comportamiento similar a lo reportado en investigaciones que trabajaron con descartes de jurel y enzima Protamex (Lamas & Argueda, 2022). Por otro lado, Pinelo et al., (2005) explicaron que al trabajar con relaciones MP:solvente que involucren un mayor volumen de solvente, se esperaría obtener resultados óptimos, ya que se considera un fenómeno adecuado según los principios de transferencia de masa, asimismo, Nepote et al. (2005) mencionan que encontraron mejores rendimientos con aquellas relaciones que involucran apenas un volumen de solvente necesario para cubrir el material de extracción para evitar saturar los componentes en la reacción.

Figura 10

Comportamiento de los efectos principales de las variables independientes en el proceso de optimización de GH (Protamex)



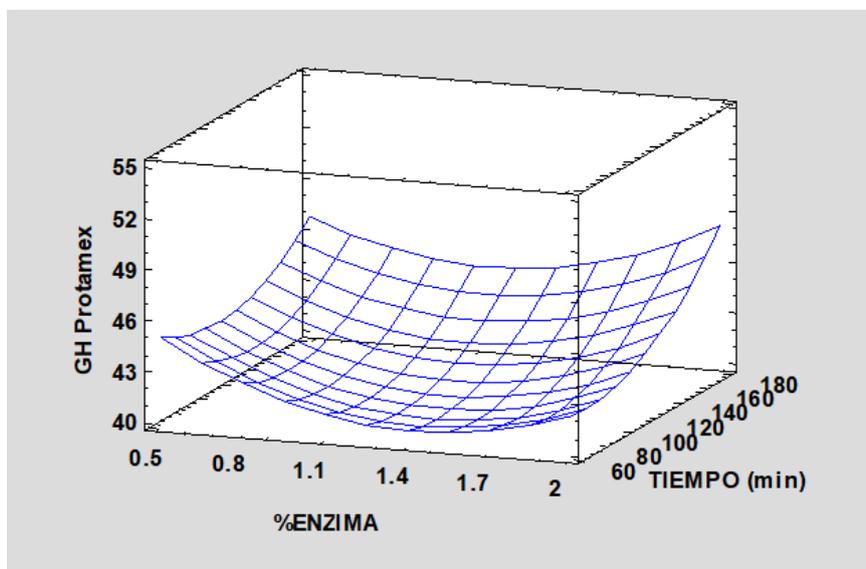
La influencia del tiempo presenta un efecto directo sobre el aumento del grado de hidrólisis a partir aproximadamente del minuto noventa, antes a este valor, el comportamiento del grado de hidrólisis disminuyó con el tiempo debido a la limitación en la actividad enzimática, mermando la probabilidad de choque molecular en los lugares requeridos (Tonon et al., 2016; Neves et al., 2017), mientras que, el porcentaje de enzima describe un efecto directo en el aumento del grado de hidrólisis a partir de un valor de aproximadamente 1,5%, anterior a este valor, se pudo observar una inflexión en el comportamiento de este efecto, sin embargo, es posible que, debido a las cantidades mínimas utilizadas, la evidencia presentada no sea suficiente para respaldar un impacto significativo.

4.3.1.1. Análisis de la Superficie de Respuesta

Se generó una representación visual tridimensional conocida como gráfica de superficie de respuesta a partir del modelo cuadrático descrito en la ecuación del apartado anterior. Su propósito fue mostrar de forma clara los efectos principales e interactivos de las variables independientes (tiempo, porcentaje de enzima manteniendo constante la relación MP:sustrato) en la hidrólisis, que en este caso es el grado de hidrólisis. El objetivo principal fue determinar de manera eficiente los valores óptimos de las variables independientes para maximizar la respuesta.

Figura 11

Superficies de respuesta para el grado de hidrólisis de la enzima Protamex en función a %Enzima y tiempo. (Factor constante: Relación MP:solvente=1.0)



En la Figura 11 se presenta la superficie respuesta obtenida después de realizar la optimización del proceso de hidrólisis, en ella se confirma que el porcentaje de enzima tuvo un efecto directo en el aumento del grado de hidrólisis a partir de un valor de aproximadamente 1,5%. Los resultados coinciden con investigaciones que utilizaron la enzima Protamex en diferentes materias primas del sector acuícola donde se evidencia que a mayor porcentaje de enzima se obtienen mejores resultados en la reacción de hidrólisis debido a que hay más sitios activos disponibles para que la masa proteica alcance a ser hidrolizada (Sifuentes-Penagos et al. 2018; Flores et al., 2020).

Se evidencia que el tiempo es un parámetro que influye directamente en el grado de hidrolisis y se da a partir del minuto 60, esto concuerda con lo obtenido por Nilsang et al. (2005) y Pereira et al. (2020), donde menciona que el grado de hidrólisis aumenta con el tiempo ya que permite una mayor exposición de la sustancia al solvente y aumenta la facilidad de rompimiento de enlaces peptídicos por la disponibilidad de sustrato (Muñoz, 2017).

4.3.1.2. Valores óptimos del grado de hidrólisis de la enzima Protamex

En la Tabla 12 se presentan la combinación de los niveles óptimos de los factores que determinan el mayor grado de hidrólisis utilizando la enzima Protamex. Se obtiene el valor de respuesta óptimo de 52,0792 %, con límite inferior de 51,1082 % y límite superior de 53,0502 %.

Tabla 12

Valores óptimos de los factores (%enzima, tiempo y MP:solvente.) para obtener un hidrolizado proteico extensivo

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
%Enzima	0,5	2	0,5
Tiempo (min)	60	180	120,588
Relación MP:solvente	0,5	1,5	0,5

4.3.2. Optimización del proceso de hidrólisis enzimática extensiva utilizando la enzima Flavourzyme

La Tabla 13 presenta los valores de grado de hidrólisis obtenidos después de realizar la hidrólisis con la enzima Flavourzyme, se obtuvieron resultados que varían de 43,76 a 61,07%. En la tabla correspondiente, se observa que estos valores presentan variaciones dependiendo de las condiciones establecidas.

Tabla 13

Resultados del proceso de hidrólisis utilizando la enzima Flavourzyme en función de diferentes valores de las variables independientes

Exp	%Enzima X₁	Tiempo X₂	MP:Solvente X₃	GH Flavourzyme (%) X₄
1	0,5 (-1)	60 (-1)	1 (0)	45,04
2	2 (1)	60 (-1)	1 (0)	46,84
3	0,5 (1)	180 (1)	1 (0)	50,68
4	2 (1)	180 (1)	1 (0)	49,40
5	0,5 (-1)	120 (0)	0.5	56,32
6	2 (1)	120 (0)	0,5 (-1)	47,98
7	0,5 (-1)	120 (0)	1,5 (1)	48,04
8	2 (1)	120 (0)	1,5 (1)	44,39
9	1,25 (0)	60 (-1)	0,5 (-1)	46,62
10	1,25 (0)	180 (1)	0,5 (-1)	61,07
11	1,25 (0)	60 (-1)	1,5 (1)	47,54
12	1,25 (0)	180 (1)	1,5 (1)	43,76
13	1,25 (0)	120 (0)	1 (0)	47,72
14	1,25 (0)	120 (0)	1 (0)	47,69
15	1,25 (0)	120 (0)	1 (0)	47,77

Para discriminar las variables determinantes en el proceso de hidrólisis se realizó el análisis de varianza del modelo ajustado para la respuesta grado de hidrólisis de la enzima Flavourzyme, cuyos resultados se presentan en la Tabla 14, en ella se muestran los efectos de la interacción de los parámetros estudiados (variables independientes). Se evidencian tres efectos significativos a un nivel de confianza del 95% ($p \leq 0,05$), de los cuales para el proceso de hidrólisis son el tiempo, MP:solvente y la interacción tiempo* MP:solvente debido a que sus valores p fueron 0,026, 0,005 y 0,008; respectivamente. El porcentaje de enzima influyó de manera no significativa sobre el proceso de hidrólisis ($p > 0,05$), es posible que, debido a las cantidades mínimas utilizadas no sea suficiente para respaldar un impacto significativo. Además, se conoce que si una variable lineal no muestra significancia ($p > 0,05$) y por el contrario su interacción lo es, dicha variable ingresara al modelo matemático a explicar el proceso (Gutiérrez & De la Vara, 2008).

Se observó que el coeficiente de determinación (R^2) para el modelo fue de 0,9197 para el grado de hidrólisis de la enzima Flavourzyme, indica que el modelo explica el 91,97% de la variabilidad en la respuesta del grado de hidrólisis; mientras que el R^2 ajustado de 77,51 % se presenta cuando existen diferentes números de variables independientes.

Por otro lado, en la ecuación 5 de regresión polinomial del grado de hidrólisis de la enzima Flavourzyme tiene como finalidad de reiterar el comportamiento de las variables independientes (factores) con respecto a la variable dependiente (grado de hidrólisis):

$$GH \text{ Protamex} = 47,73 - 1,433 X_1 + 2,359 X_2 - 3,534 X_3 - 0,15 X_1^2 + 0,41 X_2^2 + 1,61 X_3^2 - 0,77 X_1X_2 - 4,56 X_1X_3 - 4,56 X_2X_3 \dots\dots\dots Ec. 5$$

Tabla 14

Análisis de varianza del modelo ajustado para la variable respuesta (grado de hidrólisis) de la enzima Flavourzyme

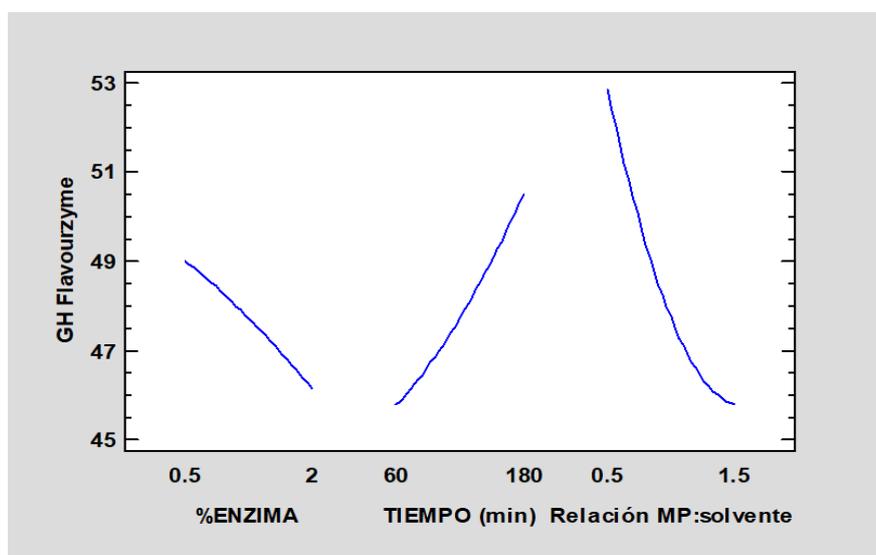
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	261,923	29,1025	6,36	0,028
Lineal	3	160,845	53,6150	11,72	0,011
Enzima	1	16,439	16,4393	3,59	0,117
Tiempo	1	44,501	44,5006	9,73	0,026
MP:Solvente	1	99,905	99,9051	21,83	0,005
Cuadrado	3	10,153	3,3843	0,74	0,572
Enzima*Enzima	1	0,085	0,0855	0,02	0,897
Tiempo*Tiempo	1	0,625	0,6252	0,14	0,727
MP:Solvente * MP:Solvente	1	9,517	9,5173	2,08	0,209
Interacción De 2 Factores	3	90,925	30,3082	6,62	0,034
Enzima*Tiempo	1	2,377	2,3766	0,52	0,503
Enzima* MP:Solvente	1	5,464	5,4639	1,19	0,324
Tiempo* MP:Solvente	1	83,084	83,0841	18,16	0,008
Error	5	22,878	4,5756		
Error Puro	2	0,003	0,0017		
Total	14	284,800			

En la Figura 12, muestra el gráfico de los efectos principales de variables estudiadas y nos proporciona una idea independiente y cualitativa de cada variable estudiada y su efecto sobre la respuesta (grado de hidrólisis), con respecto a la relación MP:solvente presentó un efecto indirecto, de acuerdo a Nilo-Rivas et al. (2000) explican una mejora en sus resultados con la disminución de la relación MP:solvente, por otro lado, Ventura et al. (2005) mencionan que la cantidad de materia prima en el sistema tiene un impacto significativo en el porcentaje de grado de hidrólisis. No obstante, es fundamental que la proporción del solvente utilizado sea adecuada para evitar la saturación de los componentes. Por lo tanto, es crucial establecer una relación adecuada entre la cantidad de solvente y la cantidad de proteínas que se deben disolver. Asimismo, Shi et al. (2005) recomiendan tomar en cuenta el valor de pH al cual se trabajó ya que esta influencia la disociación de grupos activos de la enzima, afectando la dinámica de asociación de ésta con el sustrato.

La influencia del tiempo presenta un efecto directo sobre el aumento del grado de hidrólisis, mientras que, el porcentaje de enzima describe un efecto indirecto; es decir, mostró una relación inversa menos pronunciada, lo cual difiere de los resultados reportados con la enzima Protamex.

Figura 12

Comportamiento de los efectos principales de las variables independientes en el proceso de optimización de GH (Flavourzyme)

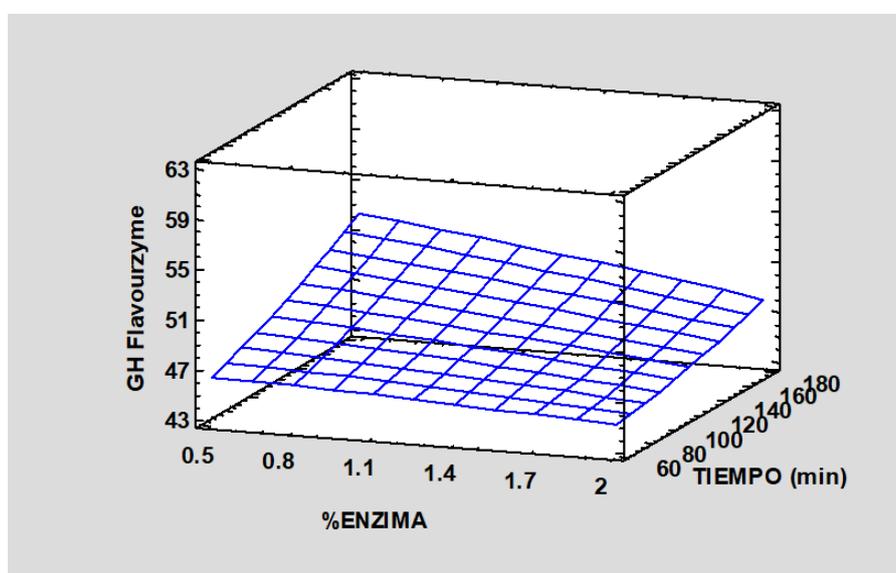


4.3.2.2. Análisis de la superficie de respuesta

La Figura 13 presenta la gráfica de superficie de respuesta a partir del modelo cuadrático descrito, de esta manera se evaluó los efectos principales e interactivos de las variables independientes (porcentaje de enzima y tiempo), permaneciendo constante la relación MP:solvente para verificar gráficamente sus efectos en la variable respuesta, que en este caso es el grado de hidrólisis.

Figura 13

Superficie de respuesta para el grado de hidrólisis de la enzima Flavourzyme en función al %Enzima y tiempo. (Factor constante: Relación MP:solvente=1.0)



La relación entre el porcentaje de enzima y el resultado obtenido mostró una razón inversa, aunque menos marcada en comparación con los hallazgos previamente reportados utilizando la enzima Protamex. Esta diferencia puede atribuirse a la naturaleza alcalina de Protamex, la cual ha demostrado tener una actividad enzimática mejor en comparación con proteasas neutras como Flavourzyme, especialmente al actuar sobre sustratos proteicos de pescado. (Dumay et al., 2006; Klompong et al., 2007). También pudo ocurrir la inhibición de la enzima por exceso de productos de hidrólisis, desnaturalización de la enzima o autohidrólisis, afectando los resultados obtenidos (Jao & Ko, 2002).

Se observa que, el factor tiempo tiene un efecto lineal con pendiente positiva, lo cual se respalda en otras investigaciones donde se ha demostrado que la relación entre el tiempo y el grado de hidrólisis se comportan directamente, sin embargo, hay que tener en cuenta que a cierto punto el grado de hidrólisis se reduce marginalmente (Nilsang et al., 2005; Bhaskar et al., 2008; Pereira et al., 2020).

En general, se evidencia que la enzima Flavourzyme tuvo mejores resultados en %GH en comparación a la enzima Protamex, tal como se reportan en investigaciones pasadas en restos de tilapia, esta diferencia puede atribuirse, independientemente de las variables estudiadas, a la forma de acción hidrolítica de las enzimas utilizadas. Protamex, en su mayoría, es una endoproteasa que rompe los enlaces internos de la proteína de pescado que no son tan accesibles al ataque de la enzima y el tiempo de la hidrólisis es lento, por su parte Flavourzyme es una combinación de endopeptidasa y exopeptidasa que tiene una especificidad para producir péptidos de tamaño pequeño y aminoácidos libres por lo tanto presenta un alto potencial en romper la cadenas terminales y centrales, donde se obtendrá péptidos de tamaño pequeño y aminoácidos libres. (Hrcková et al., 2002; Borges-Contreras et al., 2019; Suarez et al., 2022).

4.3.2.3. Optimización del grado de hidrólisis de la enzima Flavourzyme

En la Tabla 15 presenta la combinación de los niveles de los factores que mejoran el grado de hidrólisis utilizando la enzima Flavourzyme, donde los límites alto y bajo de cada factor arrojaron valores óptimos del % enzima, tiempo y relación de MP:solvente. El valor de respuesta óptimo es de 63,35 %, con límite inferior de 56,88 % y límite superior de 69,82%.

Tabla 15

Valores óptimos de los factores (%enzima, tiempo y mp: solvente.) para obtener un hidrolizado proteico extensivo

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
%Enzima	0,5	2	0,5
Tiempo (min)	60	180	180
Relación MP:solvente	0,5	1,5	0,5

4.4. Determinación de la Capacidad Antioxidante

4.4.1. Método ABTS (Ácido 2,2'- azino-bis-(3-etiltiazolinabencenosulfónico-6))

En la Tabla 16 se reportan los resultados de la capacidad antioxidante por el método del ABTS de la enzima Protamex, expresado en TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) y que varía de 4581,58 TEAC a 16702,76 TEAC; por su parte la enzima Flavourzyme, oscila de 4098,50 TEAC y 6545,20 TEAC.

Tabla 16

Capacidad antioxidante por el método del ABTS de la enzima Protamex y Flavourzyme de los 15 tratamientos

Exp	%Enzima	Tiempo	MP:solvente	ABTS Protamex (TEAC)	ABTS Flavourzyme (TEAC)
1	0,5	60	1	8438,89	4278,02
2	2	60	1	8508,00	4098,50
3	0,5	180	1	7481,22	4255,17
4	2	180	1	7675,26	4141,20
5	0,5	120	0,5	6617,56	5490,47
6	2	120	0,5	6712,42	4959,26
7	0,5	120	1,5	6661,05	5202,62
8	2	120	1,5	4581,58	4726,74
9	1,25	60	0,5	16702,76	5770,04
10	1,25	180	0,5	9251,00	6010,78
11	1,25	60	1,5	7184,07	5677,48
12	1,25	180	1,5	6690,53	4519,07
13	1,25	120	1	6940,88	6515,81
14	1,25	120	1	6997,94	6545,20
15	1,25	120	1	6934,54	6527,56

Los resultados no presentaron un comportamiento definido en la relación entre el grado de hidrólisis y la capacidad antioxidante para ambas enzimas, esto es probable a que la relación exacta puede depender de varios factores, como las condiciones de hidrólisis y la matriz alimentaria en la que se encuentre el antioxidante (Blanco et al., 2017). Al respecto, otros autores coinciden en que la diferencia de las variaciones de la capacidad antioxidante podría ser por el tipo de enzima y sustrato, sus concentraciones, el medio de reacción durante el proceso de hidrólisis, hidrofobicidad, composición del aminoácido dentro de la secuencia peptídica, entre otros (Chen et al., 1996; Rajapakse et al., 2005).

Asimismo, You et al. (2009) y Wang & Xiong (2005), explicaron la actividad de eliminación de radicales ABTS en hidrolizados proteicos utilizando la enzima Protamex, encontraron que el valor TEAC aumentó drásticamente y alcanzó un valor máximo en un grado de hidrólisis de 23%, y luego disminuyó con el aumento de este, esto sugiere que una limitada hidrólisis puede conducir a una mejor capacidad antioxidante frente a una reacción más extensa. Se obtuvo valores similares a estudios que explican que la capacidad antioxidante está influenciada por la presencia de aminoácidos que van a interactuar con los radicales libres por sus grupos SH libres, presencia de aminoácidos aromáticos, la capacidad de los grupos fenólicos como donadores de protones, conformación y abundancia de los péptidos (Chi et al., 2014; Jridi et al., 2014; Wangtueai et al., 2016; Blanco et al., 2017; Tejada, 2019).

Los resultados sugieren que la capacidad antioxidante obtenida por medio de la metodología ABTS utilizando la enzima Protamex obtuvieron mejores resultados en comparación con la enzima Flavourzyme probablemente debido a que la naturaleza de la enzima es menos específica, por lo tanto, puede hidrolizar aminoácidos aromáticos y básicos los cuales presentan gran capacidad antioxidante (Zhou et al., 2016). Además, los hallazgos indicaron que el hidrolizado proteico generado a partir de Protamex con un % GH adecuado, posiblemente contenía una mayor cantidad de aminoácidos activos o péptidos en comparación con la enzima Flavourzyme y dan lugar a productos más estables.

Es importante mencionar que el contenido proteico de la materia prima posterior a la operación de calentado se ve favorecido durante el proceso de la hidrólisis enzimática, por cuanto existe mayor disponibilidad de sustrato y liberación de fracciones peptídicas y polipeptídicas, que favorecen las características funcionales del hidrolizado (Flores et al., 2020) como lo es en este caso la capacidad antioxidante, por lo que es pertinente en estudios futuros evaluar los parámetros de esta operación unitaria.

4.4.2. Método del DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)

La Tabla 17 muestran los resultados de la capacidad antioxidante por el método del DPPH de la enzima Protamex, donde se expresó en porcentajes de inhibición y varía de 39,12 a 76,44; la enzima Flavourzyme, oscila de 49,85 y 74,97.

Tabla 17

Capacidad antioxidante por el método del DPPH de la enzima Protamex y Flavourzyme de los 15 tratamientos

Exp	%Enzima	Tiempo	MP:solvente	Dpph Protamex (%Inhibición)	Dpph Flavourzyme (%Inhibición)
1	0,5	60	1	56,76	65,58
2	2	60	1	65,10	70,58
3	0,5	180	1	76,44	74,53
4	2	180	1	66,26	66,23
5	0,5	120	0,5	39,12	49,85
6	2	120	0,5	56,03	58,71
7	0,5	120	1,5	72,41	68,60
8	2	120	1,5	74,32	73,72
9	1,25	60	0,5	48,95	50,06
10	1,25	180	0,5	43,14	53,08

11	1,25	60	15	71,87	67,53
12	1,25	180	1,5	67,31	66,92
13	1,25	120	1	64,86	74,83
14	1,25	120	1	64,95	74,9
15	1,25	120	1	64,82	74,97

Los resultados no presentaron una relación entre la capacidad antioxidante y el grado de hidrólisis. Este comportamiento podría deberse a que durante la hidrólisis, pueden ocurrir reacciones químicas y cambios en la estructura de los componentes de la materia prima, estos mismos pueden afectar las interacciones entre los antioxidantes y otros compuestos presentes en el alimento, lo que a su vez puede influir en la capacidad antioxidante. Estas interacciones pueden ser difíciles de predecir y evaluar de manera precisa (Coronado et al., 2015). Otros autores coinciden y mencionan que puede deberse a la composición peptídica y la liberación de los aminoácidos en el proceso de hidrólisis (Wu et al., 2003; Wangtueai et al., 2016).

La enzima Protamex presentó mejores resultados que el Flavourzyme. Lo mencionado concuerda a lo reportado por otros autores quienes observaron diferencias significativas en resultados de ensayos con Protamex quien exhibió mayor cantidad de eliminación de radicales DPPH frente a otras enzimas de diferente naturaleza de acción, por lo que se resalta que condiciones de proteólisis empleadas determinan en última instancia el tamaño y la composición de la fracción resultante, y por lo tanto, juega un papel crucial en la generación de hidrolizados antioxidantes y su funcionalidad (Elavarasan & Shamasundar, 2017; Bashir et al., 2018).

You et al. (2009), mencionaron la actividad de eliminación de radicales DPPH en hidrolizados proteicos del pescado dojo, encontraron que a medida que el grado de hidrólisis aumentó de 18 a 23%, la actividad de eliminación de radicales DPPH de Protamex aumentó de 83,5 a 95,5% y cuando el grado de hidrólisis se incrementó de 23 a 33%, el radical DPPH

la actividad depuradora disminuyó. En otros estudios de descartes de pescado sable negro usando la enzima Protamex reportaron actividad secuestradora de radicales libres DPPH con comportamientos similares (Benjakul, et al., 2014).

Se reportan valores de inhibición del DPPH inferiores en residuos hidrolizados de pescados tñidos utilizando pepsina (Sila & Bougatef, 2016) por lo que se infiere que el tipo de enzima utilizada en el proceso de hidrólisis tiene impacto en el resultado final, resultados que se pueden apoyar en lo reportado por Ovissipour et al., (2012) quienes trabajaron con restos de pescado esturión persa usando 5 diferentes enzimas (alcalasa, protamex, neutasa, flavourzyme y tripsina) donde demuestran niveles distintos de grado de hidrólisis y poder antioxidante. Además del tipo de enzima, también influye sus concentraciones, hidrofobicidad, composición del aminoácido dentro de la secuencia peptídica, entre otros factores menos significativos (Chen et al., 1996; Rajapakse et al., 2005).

V. CONCLUSIONES

- Los parámetros para obtener el grado de hidrólisis óptimo fue 52,08 % utilizando la enzima Protamex fueron 0,5 % de enzima, 120,6 minutos y relación MP: solvente de 0,50 g trucha/ ml H₂O; para obtener el grado de hidrólisis óptimo fue 61,07% utilizando la enzima Flavourzyme fueron 0,5 % de enzima, 180 minutos y relación MP: solvente de 0,50 g trucha/ ml H₂O, demostrando que esta última obtuvo mejores resultados.
- Se determinó que, trabajando con las enzimas Protamex y Flavourzyme, el porcentaje de enzima no fue un factor determinante en el grado de hidrólisis y las variables que tuvieron mayor influencia en el proceso de hidrolizado proteico extensivo fueron el tiempo y la relación MP:solvente.
- La capacidad antioxidante por el método del DPPH utilizando la enzima Protamex obtuvo el mejor valor de 76,44 % de inhibición que la enzima Flavourzyme; por el método del ABTS utilizando la enzima Protamex se obtuvo el mejor valor de 16702,76 TEAC frente a la enzima Flavourzyme.

VI. RECOMENDACIONES

- Complementar el estudio con una determinación de pesos moleculares.
- Complementar la investigación con el estudio de tamaño e identificación de péptidos para identificar posibles péptidos bioactivos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albuzio, A., Durigon, V. y Provenzano, M. R. (2011). Anaerobic digestion of trout by-products. *Waste and Biomass Valorization*, 2(2), 127–131. <https://doi.org/10.1007/s12649-011-9070-x>
- AOAC. (2016). *Official Methods of the Association of Official Agricultural Chemist's International*. (20a ed.). Association of Official Analytical Chemists.
- Arias, A., Pérez, S., López, O., Mendoza, R. y Aguilera, C. (2016). Capacidad antioxidante de péptidos obtenidos de hidrolizados de tilapia con bromelina y papaína. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1 (2), 782–788. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/2/9/136.pdf?fbclid=IwAR1h7t9-n1CmBYYHxPfDCKot9jA3ZmKcP2HFUSaQjIkZExlWVfmWIjOQwyU>
- Arnao, M. B. Cano, A. y Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239–244. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(00)00324-1)
- Badui, S. (2013). *Química de los alimentos*. (5° ed.). Pearson Educación de México.
- Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N.M. y Nunes, M.L. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*, 45 (1), 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.07.019>

- Bashir, K. M. I., Park, Y. J., An, J. H., Choi, S. J., Kim, J. H., Baek, M. K., Kim, A., Sohn, J. H. y Choi, J. S. (2018). Antioxidant properties of *Scomber japonicus* hydrolysates prepared by enzymatic hydrolysis. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 27(1), 107-121. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10498850.2017.1407013>
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C. y Lalitha, R. G. (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*, 99(2), 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.015>
- Bechtel, P. J., Watson, M. A., Lea, J. M., Bett-Garber, K. L. y Bland, J. M. (2019). Properties of bone from Catfish heads and frames. *Food Science & Nutrition*, 7(4), 1396–1405. <https://doi.org/10.1002/fsn3.974>
- Benítez, R., Ibarz, A. y Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227-236. <https://www.redalyc.org/pdf/535/53542208.pdf?fbclid=IwAR1h7t9-n1CmBYYHxPfDCKot9jA3ZmKcP2HFUsaQjIkZExlWVfmWjOQwyU>
- Benjakul, S., Yarnpakdee, S., Senphan, T., Halldorsdottir, S. M. y Kristinsson, H. G. (2014). Fish protein hydrolysates: production, bioactivities, and applications. *Antioxidants and functional components in aquatic foods*, 237-282. https://www.researchgate.net/publication/288802982_Fish_protein_hydrolysates_Production_bioactivities_and_applications
- Benzie, I.F. y Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power":the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-6. <https://www.semanticscholar.org/paper/The-ferric-reducing-ability-of-plasma-%28FRAP%29-as-a-Benzie-Strain/cbfeac924b3835569bbb0b1182336e2c196ab5b0?p2df>

- Blanco, M., Vázquez, J., Pérez-Martín, R. y Sotelo, C. (2017). Hydrolysates of fish skin collagen: An opportunity for valorizing fish industry byproducts. *Marine Drugs*, 15(5), 131. <https://doi.org/10.3390/md15050131>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie. Food Science and Technology*. 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5)
- Brito, R. E. (2016). *Antioxidantes alimentarios: mecanismos de oxidación eléctrica, medida electroquímica de capacidad antioxidante y composición en tes, infusiones y especias* (Tesis de doctorado). <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=63914>
- Borges-Contreras, B., Martínez-Sánchez, C. E., Herman-Lara, E., Rodríguez-Miranda, J., Hernández-Santos, B., Juárez-Barrientos, J. M. y 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://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jmf.2018.0163>
- Cano, A. y Arnao, M. B. (2017). ABTS/TEAC (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)/Trolox®-Equivalent Antioxidant Capacity) radical scavenging mixed-mode assay. *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity: Recent Trends and Applications*, 117–139. <https://doi:10.1002/9781119135388.ch7>
- Carvajal Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&tlng=es.

- Cavieres, C. (2010). *Determinación de la pérdida de calidad funcional, química, sensorial y microbiológica del belly de trucha arcoiris (Oncorhynchus mykiss) durante su conservación en refrigeración* (Tesis de pregrado). http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/115625/cavieres_cl.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F. y Nokihara, K. (1996). Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on the Antioxidative Peptide Isolated from Digests of a Soybean Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2619–2623. <https://doi:10.1021/jf950833m>
- Chi, C.-F., Cao, Z.-H., Wang, B., Hu, F.-Y., Li, Z.-R. y Zhang, B. (2014). Antioxidant and Functional Properties of Collagen Hydrolysates from Spanish Mackerel Skin as Influenced by Average Molecular Weight. *Molecules*, 19(8), 11211–11230. <https://doi:10.3390/molecules190811211>
- Chuesiang, P. y 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:10.1111/ijfs.12762>
- Coral, C. B. S., Carmen, G. C., Ángel, R. B. M. y Consuelo, L. N. (2012). *Nutrición, salud y alimentos funcionales*. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=hfQMXBIiydgC&oi=fnd&pg=PA11&dq=alimentos+funcionales&ots=_Y7cAuMnUE&sig=C4dXgbl4mAHzk-EyIYVIMN1BDN4
- Coronado, M., Vegas, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M. y Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr*, 42(2), 206-212. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v42n2/art14.pdf>

- De Aguiar, A. C., Visentainer, J. V. y Martínez, J. (2011). Optimising drying parameters to maximise omega-3 essential fatty acid yields in striped weakfish (*Cynoscion striatus*) industry waste. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(12), 2475–2481. <https://doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02770.x>
- Decreto Supremo N° 017-2011 - Decreto que modifica el Reglamento del procesamiento de descarte y residuos de recursos hidrobiológicos (17 de noviembre del 2011). *Diario Oficial El Peruano*, 2011, 17, 11.
- Decreto Supremo N° 015-2016 - Disposiciones sobre la actividad de procesamiento pesquero para la producción de concentrados proteicos (23 de julio del 2016). *Diario Oficial El Peruano*, 2016, 23, 07.
- Decreto Supremo N° 020-2022 - Decreto que aprueba el Reglamento sectorial de inocuidad para las actividades pesqueras y acuícolas (24 de noviembre del 2022). *Diario Oficial El Peruano*, 2022, 24, 11
- De Heredia, C. B. (2016). Alimentos funcionales. *Farmacia profesional*, 30(3), 12-14. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7717337>
- Dumay, J., Allery, M., Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen, P., Carbonneau, M. E. y Bergé, J. P. (2009). Optimization of hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) heads with Protamex: enhancement of lipid and phospholipid extraction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(9), 1599–1606. <https://doi:10.1002/jsfa.3631>
- Dumay, J., Barthomeuf, C. y Berge, J. P. (2004). How Enzymes May Be Helpful for Upgrading Fish By-Products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 13(2), 69–84. https://doi:10.1300/j030v13n02_07.
- Elavarasan, K. y Shamasundar, B. A. (2017). Antioxidant and emulsion properties of freshwater carps (*Catla catla*, *Labeo rohita*, *Cirrhinus mrigala*) protein hydrolysates prepared using flavorzyme. *Food Science and Biotechnology*, 26(5), 1169–1176. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0154-7>.

- FAO. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura: Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*.
<https://books.google.com.pe/books?id=PNRVDwAAQBAJ&pg=PA52&dq=que+son+subproductos+pesqueros+PRODUCE&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjbiIXps7sAhVMMLkGHdTbIMQ6AEwBHoECAUQA#v=onepage&q=que%20son%20subproductos%20pesqueros%20PRODUCE&f=false>
- Flores, J., Caballero, C. y Moreira, M.A. (2008). Una interpretación aproximada del concepto de Hidrólisis en estructuras peptídicas en un Curso de Bioquímica del IPC en el contexto de la Teoría de los Campos Conceptuales de Vergnaud. *Revista de Investigación*, 32 (64), 135-160. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-29142008000200007&lng=es&tlng=es.
- Flores, S., Guevara, A., Cordova, J. S. y Solari, A. (2020). Efecto del tiempo de hidrólisis enzimática sobre las propiedades tecno-funcionales y capacidad antioxidante de la papa *Dioscorea gigas*. *Ciencia e Investigación*, 23(2), 15–21.
<https://doi.org/10.15381/ci.v23i2.19377>
- Florez, M. (2017). *Elaboración de biofertilizante líquido utilizando subproductos del procesamiento de trucha (*Oncorhynchus mykiss*)*. (Tesis de pregrado).
<http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3271/florez-jalixto-marco-antonio.pdf?sequence=1>
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G. y Ritieni, A. (1999). Method for Measuring Antioxidant Activity and Its Application to Monitoring the Antioxidant Capacity of Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1035–1040.
<https://doi:10.1021/jf980496s>

- Gaviria, E. (2017). *Obtención de péptidos activos a partir de la hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris*. (Tesis de maestría). <http://repositorio.unicauca.edu.co:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2453/Obtenci%3Bn%20de%20p%3Ba9ptidos%20activos%20a%20partir%20de%20la%20hidr%3B3lisis%20enzim%3A1tica%20de%20v%3Adsceras%20de%20trucha%20arco%3Adris.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Grajales, O. (2005). *Apuntes de bioquímica vegetal: Base para su aplicación fisiológica* (pp. 42-49). https://books.google.com.pe/books?id=_zC3SseYwoIC&vq=determinaci%C3%B3n+de+la+actividad+enzim%C3%A1tica&dq=determinaci%C3%B3n+de+la+actividad+enzim%C3%A1tica&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Grillo, J., Gozzer, R., Sueiro, J. C. y Riveros, J.C. (2018). *Producción ilegal de harina de pescado en Perú a partir de anchoveta extraída por la flota artesanal y de menor escala*. https://peru.oceana.org/sites/default/files/anchoveta_corregido2_0.pdf
- Guadix, A., Guadix, E., Páez-Dueñas, M., González-Tello, P. y Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79-89. <https://www.ugr.es/~ars/abstract/41-79-00.pdf>
- Guerard, F., Guimas, L. y Binet, A. (2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19- 20, 489–498. [https://doi:10.1016/s1381-1177\(02\)00203-5](https://doi:10.1016/s1381-1177(02)00203-5)
- Gutiérrez, H. y De la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. (2° ed.). McGraw-Hill/Interamericana Editores.
- Guzmán, V. y Calsera, Y. (2019). *Compuestos bioactivos en alimentos funcionales y suplementos alimenticios: Rol en la salud, prevención de enfermedades y regulación en latinoamérica y el mundo*. <https://infoalimentarios.files.wordpress.com/2019/08/compuestos-bioactivos-salud-y-regulacion-2019-2.pdf>

- He, S., Franco, C. y Zhang, W. (2011). Characterisation of processing wastes of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*) harvested in Australia. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(9), 1898–1904. <https://doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02699.x>
- Hidalgo, J. (2011). *Tratado de enología*.. <https://books.google.com.pe/books?id=og-CDwAAQBAJ&pg=PA480&dq=ENZIMAS+ENDOPROTEASAS+Y+EXOPROTEASAS&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjlyPad5J7sAhXpGbkGHekOBRYQ6AEwBXoECAyQAg#v=onepage&q=ENZIMAS%20ENDOPROTEASAS%20Y%20EXOPROTEASAS&f=false>
- Hleap Zapata, J. I. y Gutiérrez Castañeda, C. A. (2017). Hidrolizados de pescado – producción, beneficios y nuevos avances en la industria. -Una revisión. *Acta Agronómica*, 66(3), 311–322. <https://doi:10.15446/acag.v66n3.52595>
- Hrkova, M., Rusnakova, M. y Zemanovic, J. (2002). Enzymatic hydrolysis of defatted soy flour by three different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Czech journal of food sciences*, 20(1), 7-14. <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/50861.pdf>
- Imm, J. Y. & Lee, C. M. (1999). Production of Seafood Flavor from Red Hake (*Urophycis chuss*) by Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6), 2360– 2366. <https://doi:10.1021/jf9811020>
- ITP. (2004). *Manual de Métodos No Acreditados LABS-ITP*. ITP
- JAO, C.-L. y KO, W.-C. (2002). 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice. *Fisheries Science*, 68(2), 430–435. <https://doi:10.1046/j.1444-2906.2002.00442.x>

- Jridi, M., Lassoued, I., Nasri, R., Ayadi, M. A., Nasri, M. y Souissi, N. (2014). Characterization and Potential Use of Cuttlefish Skin Gelatin Hydrolysates Prepared by Different Microbial Proteases. *BioMed Research International*, 2014, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/461728>
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. y Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102(4), 1317–1327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.01>
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J. y Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726–732. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612005000400016>
- Lahl, W.J. y Grindstaff, D.A. (1989). Spices and seasonings: Hydrolyzed proteins. In *Proceedings of the 6th SIFST Symposium on Food Ingredients-Applications, Status and Safety*, Singapore Institute of Food Science and Technology. 51–65
- Lamas, D. y Agueda, E. M. (2022). Hidrólisis enzimática de residuos del procesamiento de surel (*Trachurus lathami*): caracterización de las fracciones obtenidas. *Revista Científica*, 30(2). <https://www.rcientifica.com/index.php/revista/article/view/277>
- Lavid, C. (2019). *Determinación de dosis de enzimas y tiempos óptimos de hidrólisis para mejorar la digestibilidad de las proteínas obtenidas de residuos de pescado* (Tesis de maestría). <http://repositorio.espam.edu.ec/bitstream/42000/1052/1/TTMAI2.pdf>
- Lehninger A. (2000). *Principios de Bioquímica*. (3° ed, pp.1013). Omega.
- López-Alarcón, C. y Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>

- López, M. y Sampedro, G. (1977). Fabricación de hidrolizados de proteína de pescado. *Inv.Pesq*.http://digital.csic.es/bitstream/10261/90659/1/Lopez_Benito_Sampedro_1977.pdf
- Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. <http://repository.unilasallista.edu.co/dspace/handle/10567/133>
- Mahmoud, M. I. (1994). Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technology*, 58, 89–95.
- Mariaca, C., Zapata, M. y Uribe, P. (2016). Oxidación y antioxidantes: hechos y controversias. *Rev Asoc Colomb Dermatol*, 24(3), 162-173. https://revistasocolderma.org/sites/default/files/oxidacion_y_antioxidantes_hechos_y_controversias.pdf
- Martínez. (2003). *Producción de un ensilado biológico a partir de vísceras de pescado de las especies Prochilodus mariae (coporo), Pseudoplatystoma fasciatum (bagre rayado) y Phractocephalus hemiliopterus (cajaro)* (Tesis de pregrado). <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/20113>
- Martínez, E., Estrems, M., Valentin, M., Garrido, A. y Guillen, J. (2009). *Aplicación de la metodología de superficie de respuesta para la optimización de parámetros de soldadura en función de la distribución térmica resultante*. XIII Congreso Internacional De Ingeniería De Proyectos. https://www.aepro.com/files/congresos/2009badajoz/Ciip09_0476_0489.2506.pdf
- Missau, J., Scheid, A. J., Foletto, E. L., Jahn, S. L., Mazutti, M. A. y Kuhn, R. C. (2014). Immobilization of commercial inulinase on alginate–chitosan beads. *Sustainable Chemical Processes*, 2, 13. <https://link.springer.com/article/10.1186/2043-7129-2-13>

- Montero, M. (2021). Hidrolizados Proteicos A Partir De Subproductos De la industria pesquera: obtención y funcionalidad. *Agronomía Mesoamericana*, 32(2), 681-699. https://www.redalyc.org/journal/437/43766744024/html/#redalyc_43766744024_ref40.
- Muñoz, A., Fernández, A., Ramos, F. y Alvarado, A. (2007). Evaluación de la actividad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en vinos producidos en Perú. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 73(1),30-40. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810634X2007000100004
- Nepote, V., Grosso, N. R. y Guzman, C. A. (2005). Optimization of extraction of phenolic antioxidants from peanut skins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 33-38. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.1933>
- Neves, A. C., Harnedy, P. A., O’Keeffe, M. B., Alashi, M. A., Aluko, R. E. y FitzGerald, R. J. (2017). Peptide identification in a salmon gelatin hydrolysate with antihypertensive, dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidant activities. *Food Research International*, 100, 112–120. <https://doi:10.1016/j.foodres.2017.06.065>
- Nielsen, P. M. (2009). *Enzymes in Food Technology*. (2° ed., pp. 292–319). <https://doi:10.1002/9781444309935.ch13>
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M. y Assavanig, A. (2005). Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering*, 70(4), 571–578. <https://doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.10.011>
- Oliveira Só, Y. A., Abreu Silva, M., Carvalho, F. M., Kiametis, A. S. y Gargano, R. (2020). Combining electronic properties and virtual screening for the development of new antioxidants: Trolox-like compounds as application example. *International Journal of Quantum Chemistry*, 120(11). <https://doi.org/10.1002/qua.26194>

- Ovissipour, M., Regenstein, J. M., Gildberg, A. y Rasco, B. (2012). Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 73-79. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-009-0225-8>
- Palou, N. (2011). *Mejoramiento de evaluación sensorial de concentrados proteicos de co-productos de la industria salmonicultora chilena, por medio de la optimización de los parámetros involucrados en el proceso de hidrólisis enzimática*. (Tesis de pregrado). <https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/140587/Mejoramiento-de-evaluacion-sensorial-de-concentrados-proteicos-de-co-productos-de-la-industria-salmonicutora-chilena.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Pandia, S., Solari, A. y Albrecht-Ruiz, M. (2013). Hidrolizado proteico obtenido a partir de residuos de anchoveta (*Engraulis Ringens*): Evaluación de sus propiedades funcionales. *ITP*, 11, 44-51. <http://repositorio.itp.gob.pe/bitstream/ITP/45/1/publicacion%2011.8.pdf>
- Pereira, N., Fangio, M., Rodriguez, Y., Garbari, M. y Fernandez A. (2020). Obtención de hidrolizados proteicos a partir de desechos de la industria pesquera. *Oceanografía: desvelando la belleza, los misterios y los desafíos del mar*. <https://sistema.editoraartemis.com.br/index.php/admin/api/artigoPDF/31869>
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J. y Núñez, M. J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 2111-2117. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0488110>
- Piotrowicz, I. y Mellado, M. (2015). Antioxidant hydrolysates production from Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) with different enzymes. *International Food Research Journal*, 22(3), 1203-1211. <http://www.agris.upm.edu.my:8080/dspace/bitstream/0/12583/1/Antioxidant%20hydrolysa%20tes%20production%20from%20Argentine%20anchovy.pdf>

- Pisoschi, A. M. y Negulescu, G. P. (2012). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 01(01). <https://doi:10.4172/2161-1009.1000106>
- Pometto, A., Shetty, K., Paliyath, G. y Levin, R.E. (2005). *Food Biotechnology* (2°ed.). CRCPress.<https://doi.org/10.1201/9781420027976><https://doi.org/10.1201/9781420027976>
- Prior, R. L., Wu, X. y Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 53(10), 4290–4302. <https://doi:10.1021/jf0502698>
- PRODUCE. (2022). Anuario estadístico pesquero y acuícola 2022. <https://ogeiee.produce.gob.pe/index.php/en/oe-documentos-publicaciones/publicaciones- anuales/itemlist>
- Rajapakse, N. et al. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38 (2), 175–182
- .Ramírez, M. (2017). Péptidos con actividad antioxidante provenientes de fuentes animales y vegetales. *Propiedades funcionales de hoy*. https://books.google.com.pe/books?id=8zo3DgAAQBAJ&pg=PA37&lpg=PA37&dq=propiedades+biofuncionales&source=bl&ots=ZKOBQRssP2&sig=ACfU3U1cjPGfYYJpsjtJgCqd9HXBvKo7Mw&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwj8_6jO76DsAhWsKLkGHY4bCRwQ6AEwB3oECAEQAg#v=onepage&q=propiedades%20biofuncionales&f=false
- Reguillo, M. (2018). *Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas*. (Tesis de pregrado). <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MARIA%20DEL%20CARMEN%20REGUILLO%20MU%C3%91OZ.pdf>

- Rivas R, N., Dench, J. E. y Caygill, J. C. (2000). Nitrogen extractability of sesame (*Sesamum indicum* L.) seed and the preparation of two protein isolates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32(6),565-571. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.2740320607>
- Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. y Verde-Star, M. (2016). Actividad antioxidante y toxicidad. *Investigación en plantas de importancia médica*. https://books.google.com.pe/books?id=8kgcDQAAQBAJ&dq=capacidad+antioxidante+pdf&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Rodríguez, J., Hleap, J., Estrada, F., Clavijo, J. y Perea, N. (2011). *Gestión de residuos pecuarios en sistema de producción más limpia*. <http://bdigital.unal.edu.co/11644/1/9789587610123.pdf>
- Rodríguez, J. C., Cabello, A. M., Figuera, B., Ramos, M. y Vallenilla, O. (2001). Caracterización y aprovechamiento de la pulpa del caribe colorado (*Pigocentrus cariba* Humboldt 1821) para la elaboración de productos alimenticios. *Interciencia*, 26(4), 161. <https://search.proquest.com/openview/3c93dced6af85e5ab16b1d05fd3ffbeb/1?pq-origsite=gscholar&cbl=27688>
- Rodríguez-Díaz, J. C., Kurozawa, L. E., Netto, F. M. y Hubinger, M. D. (2011). Optimization of the Enzymatic Hydrolysis of Blue Shark Skin. *Journal of Food Science*, 76(7), C938–C949. <https://doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02318.x>
- Rustad, T., Storro, I. y Slizyte, R. (2011). Possibilities for the utilisation of marine by-products. *Food Science & Technology*, 46(10), 2001-2014. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02736.x>
- Saavedra, M. (2016). *Hidrólisis enzimática de proteína de residuo de merluza a alta concentración de sólidos sin control de pH*. (Tesis de pregrado). <https://repositorio.usm.cl/bitstream/handle/11673/23638/3560900258367UTFSM.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Serrano, J. (1989). El proceso agroindustrial y la tecnología. *Cesa Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas Proyecto de Apoyo al Sector Pesquero Artesanal de la Zona de Valdivia*.

Venezuela. https://books.google.com.pe/books?id=WcssGfI8n_QC&pg=PP51&dq=que%20son%20de sechos%20pesquero&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjI34rx0ojsAhWdEbkGHXO9AYIQ6AEwBXoECAMQAQ&f bclid=IwAR2dCYZzcQuwPLv06yITya-jn7-IYsTxVzy7rxLnDnsToRKXHbzcrPNhsfU#v=onepage&q=que%20son%20desechos%20pesquero&f=false

Sifuentes-Penagos, G., León-Vásquez, S. y Castillo, A. (2018). Hidrólisis de las proteínas de anchoveta (*Engraulis ringens*) entera por acción de la enzima Protamex™. *Scientia Agropecuaria*, 9(1), 93-102. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.01.10>

Sánchez A. y Vázquez A. (2017). Bioactive peptides: A review, *Food Quality and Safety*, 1(1) 29–46. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx006>

Sila, A. y Bougatef, A. (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods*, 21, 10–26. <https://doi:10.1016/j.jff.2015.11.007>

Shi, D., He, Z. y Qi, W. (2005). Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin. *Process Biochemistry*, 40(5), 1943-1949. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959204003395>

Suarez, L. M., Salcedo, J.G. y Zapata, J. E. (2022). Actividad biológica de hidrolizados de hoja de yuca variedad venezolana obtenidos con diferentes enzimas microbianas. *Información tecnológica*, 33(2), 77-88. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642022000200077>

Surówka, K. y Fik, M. (1994). Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads: II—Application of pepsin to the production of protein hydrolysate.

Journal of the Science of Food and Agriculture, 65(3), 289–296.
<https://doi:10.1002/jsfa.2740650305>

Taheri, A, Anvar, SAA, Ahari, H y Fogliano, V. 2012. Comparison the functional properties of protein hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12 (1), 154-169.
<https://jifro.ir/article-1-879-en.pdf>

Tejada, E. (2019). *Actividad antimicrobiana y antioxidante de hidrolizado de gelatina obtenido de las pieles de *Sarda chiliensis chiliensis* “Bonito” como residuos de la actividad pesquera en el Perú*. (Tesis de pregrado).
https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/10424/Tejada_pe.pdf?sequence=3

Tonon, R. V., Dos Santos, B. A., Couto, C. C., Mellinger-Silva, C., Brígida, A. I. S. y Cabral, L. M. (2016). Coupling of ultrafiltration and enzymatic hydrolysis aiming at valorizing shrimp wastewater. *Food Chemistry*, 198, 20-27.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814615302399>

Valencia, P., Pinto, M. y Almonacid, S. (2014). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, 49(2), 258-264. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135951131300682X>

Varelis, P., Melton, L. y Shahidi, F. (2019). *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 383). Elsevier.

Ventura, M., Elías, C. y Salvá, B. (2005). Obtención de aislado proteico a partir de nuez de marañón. Lima, Perú. Departamento de Tecnología de Alimentos y Productos Agropecuarios, UNALM.

Vioque, J. y Millán, F. (2005). Los hidrolizados proteicos en alimentación: Suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional. *CTC Alimentación*, 26, 96-102.
<https://digital.csic.es/handle/10261/5750>

- Wang, L. L. y Xiong, Y. L. (2005). Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9186-9192. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf051213g>
- Wangtueai, S., Siebenhandl-Ehn, S. and Haltrich, D. (2016). Optimization of the preparation of gelatin hydrolysates with antioxidative activity from lizardfish (*Saurida spp.*) scales gelatin. *Chiang Mai Journal of Science*, 43(1), 1122-1133
- Wu, H.-C., Chen, H.-M. y Shiau, C.-Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36(9-10), 949–957. [https://doi:10.1016/s0963-9969\(03\)00104-2](https://doi:10.1016/s0963-9969(03)00104-2)
- Yaghoubzadeh, Z., Peyravii Ghadikolaii, F., Kaboosi, H., Safari, R. y Fattahi, E. (2020). Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptides from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin hydrolysate. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), 625–632. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09869-5>
- You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H. y Yang, B. (2009). Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 235-240. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856408000842>
- Zamora, J. D. (2007). Antioxidants: micronutrients fighting for health. *Revista chilena de nutrición*, 34(1), 17-26. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182007000100002>
- Zapata, José E., Moya, M. y Figueroa, O. A.. (2019). Enzymatic Hydrolysis of Protein of Rainbow Trout Viscera (*Oncorhynchus mykiss*). Effect of Type of Enzyme, Temperature, pH and Stirring Speed. *Información tecnológica*, 30(6), 63-72. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642019000600063>

Zhou, H., Wang, C., Ye, J., Tao, R., Chen, H. y Cao, F. (2016). Effects of enzymatic hydrolysis assisted by high hydrostatic pressure processing on the hydrolysis and allergenicity of proteins from ginkgo seeds. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 839-848. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-016-1676-3>

Zugarramurdi, A. (1998). *Economía de la calidad y de la seguridad. Ingeniería económica aplicada a la industria pesquera.*

https://books.google.com.pe/books?id=Q_eoohQZ9PIC&pg=PA209&dq=residuos+y+desechos+de+la+industria+pesquera&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwiH_-qCm4jsAhWIIkGHfPOBnsQ6AEwBnoECAAQA#v=onepage&q=residuos%20y%20de%20desechos%20de%20la%20industria%20pesquera&f=false

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Homogenización de residuos de trucha con agua destilada



Anexo 2. Medición del pH para la obtención del hidrolizado proteico



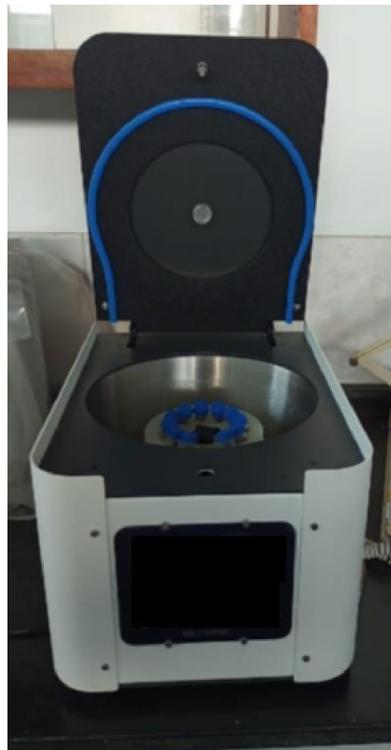
Anexo 3. Las muestras en baño maría (control de temperatura)



Anexo 4. Inactivación de la enzima



Anexo 5. Centrifugación



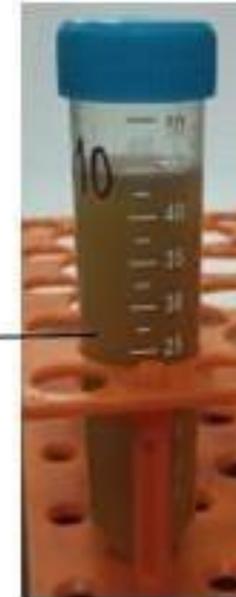
Anexo 6. Obtención del hidrolizado



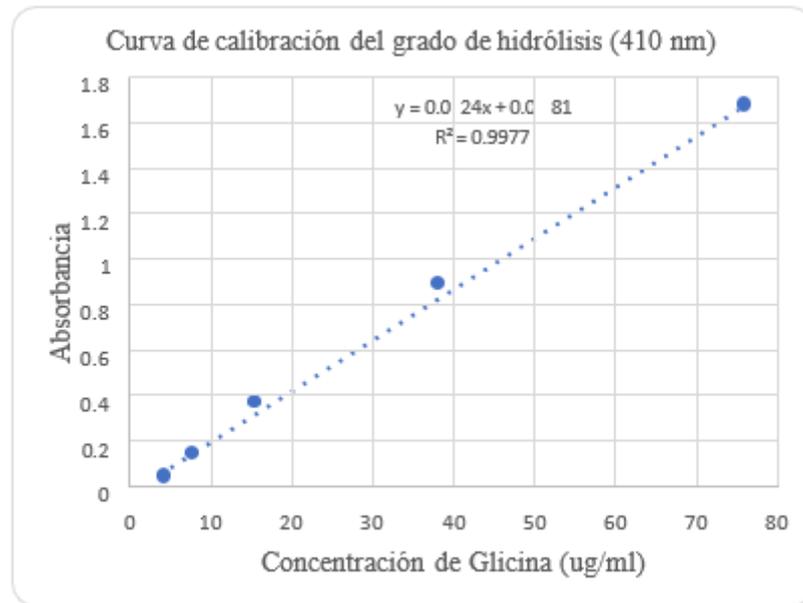
FASE OLEOSA

FASE ACUOSA
(HIDROLIZADO
PROTECIO)

RESIDUO SÓLIDO



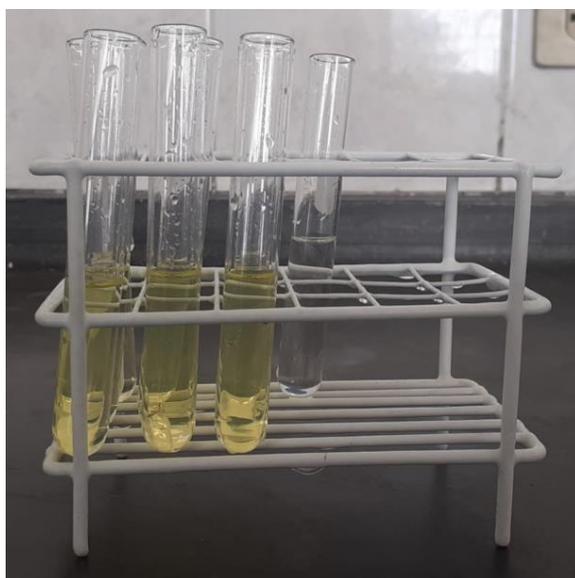
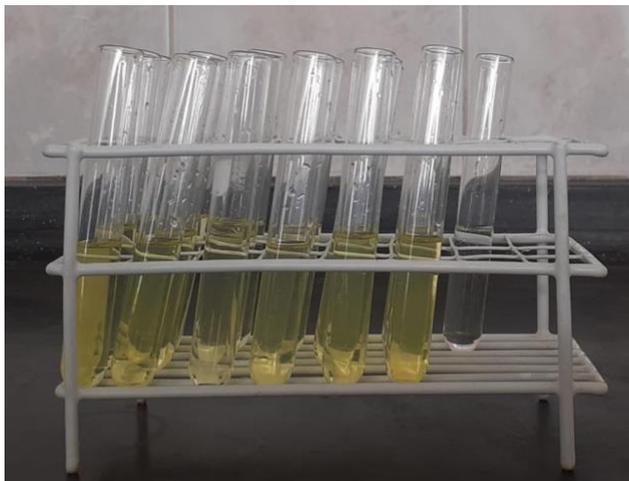
Anexo 7. Curva de calibración del grado de hidrólisis



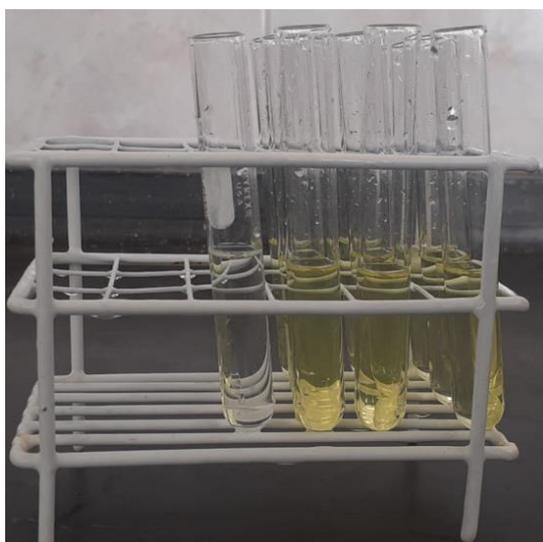
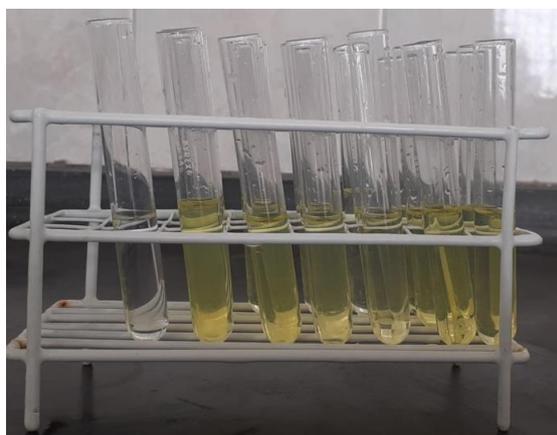
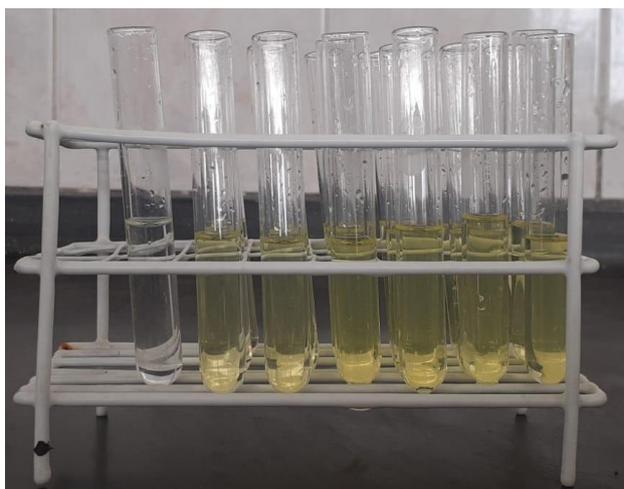
Anexo 8. Diferentes concentraciones de glicina para la obtención de la curva del grado de hidrólisis



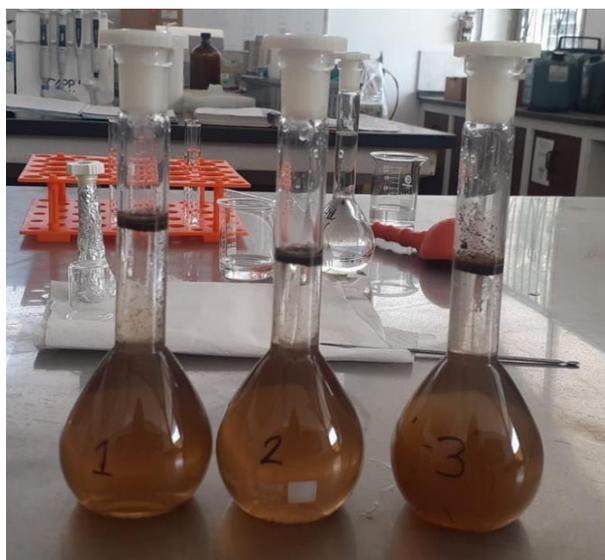
Anexo 9. Grado de hidrólisis de la enzima Flavourzyme de las 15 muestras de hidrolizado



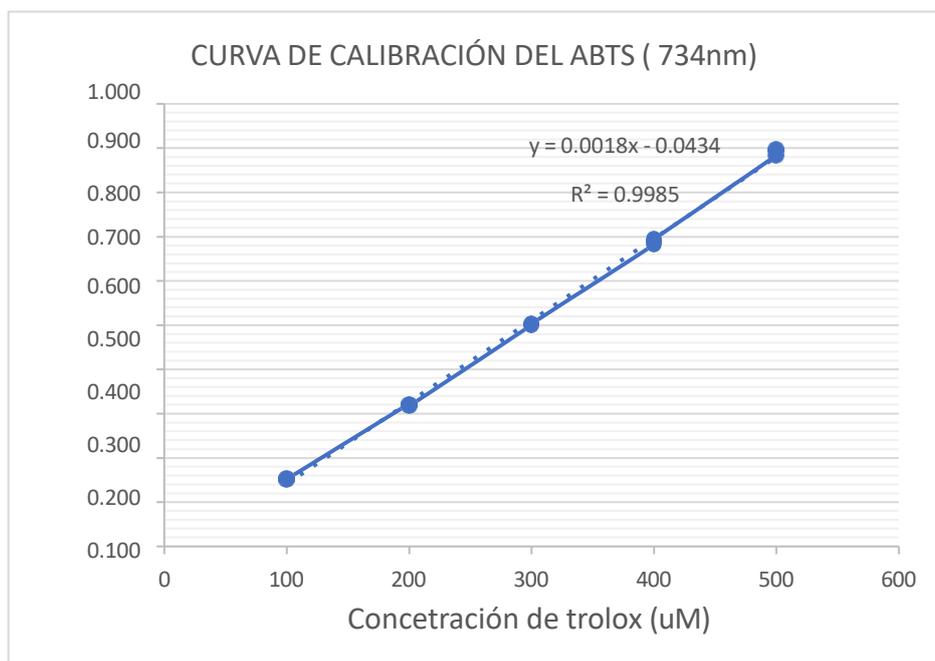
Anexo 10. Grado de hidrólisis de la enzima Protamex de las 15 muestras de hidrolizado



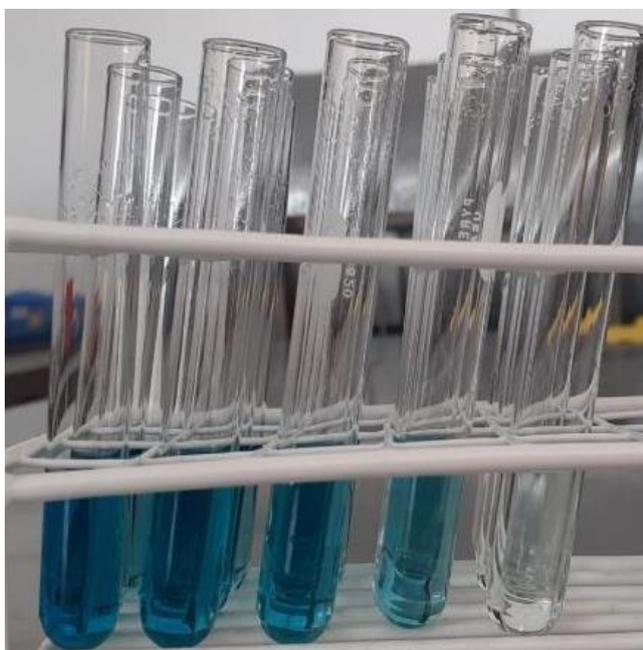
Anexo 11. Hidrólisis ácida de los subproductos de la trucha arcoíris



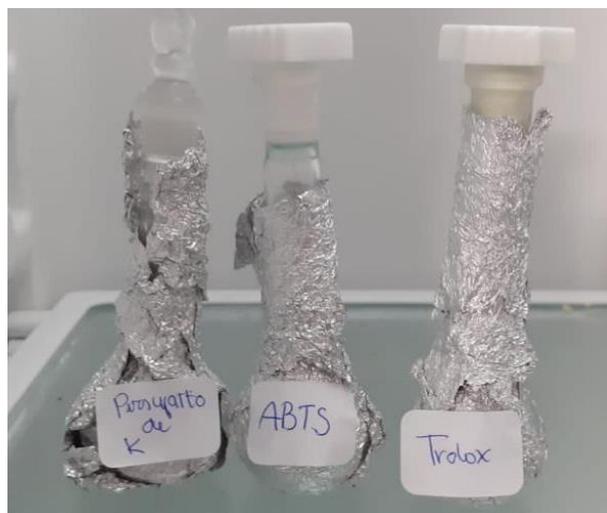
Anexo 12. Curva de calibración del ABTS



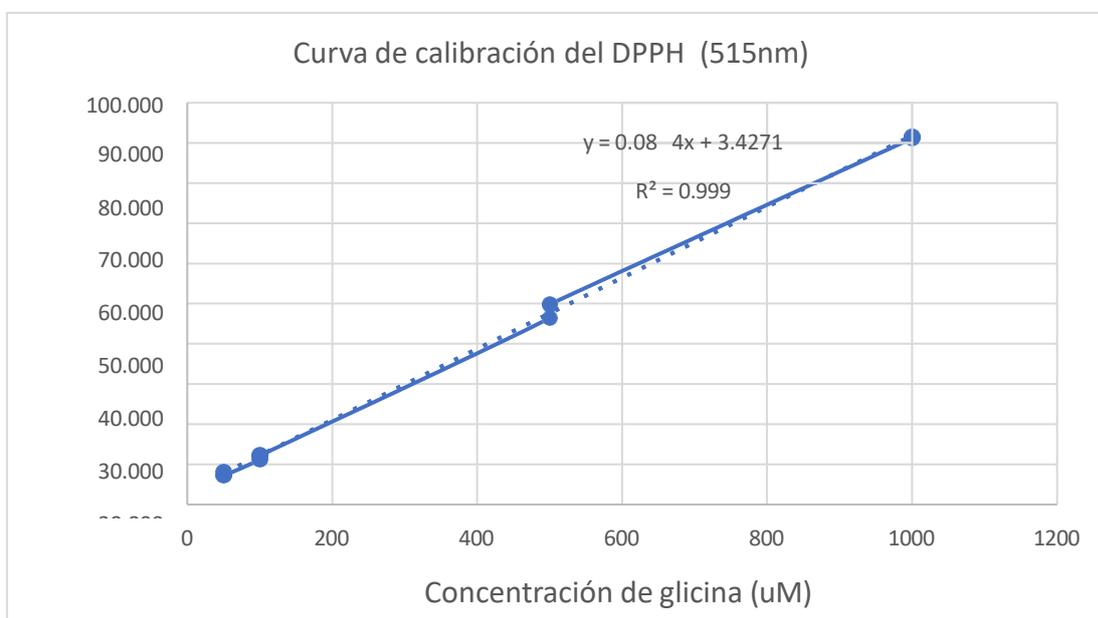
Anexo 13. Diferentes concentraciones de trolox para la obtención de la curva del ABTS.



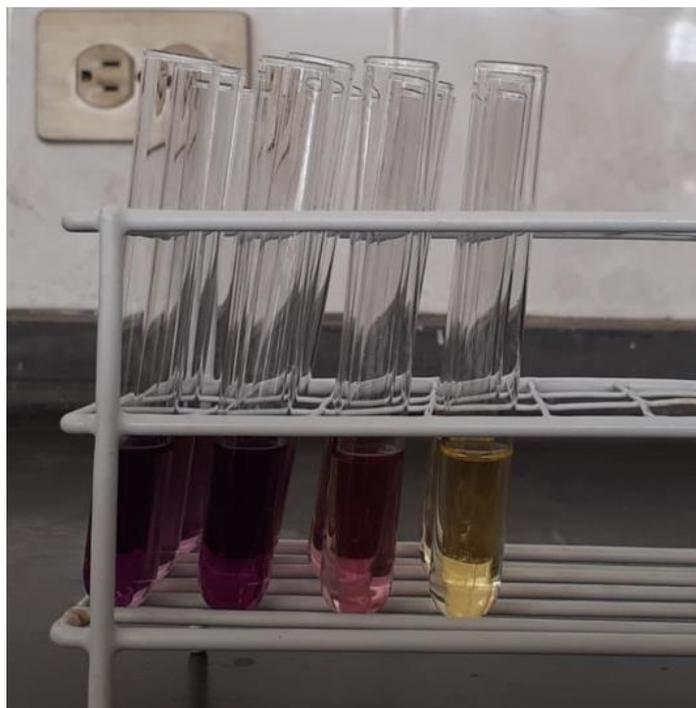
Anexo 14. Soluciones de Persulfato de potasio, trolox y ABTS+



Anexo 15. Curva de calibración del DPPH



Anexo 16. Diferentes concentraciones de trolox para la obtención de la curva del DPPH



Anexo 17. Solución del DPPH y diferentes concentraciones de trolox.



Anexo 18. Determinación de la curva estándar Glicina

Con la finalidad de determinar el contenido de nitrógeno total en el hidrolizado proteico de los subproductos de la trucha arcoíris se elaboró la curva estándar a partir de glicina con una concentración de 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, pesando 0,0015 g de glicina y se enrasa con agua destilada hasta un volumen final de 10mL. A partir de esta solución madre, se preparan los distintos puntos que integrarán la recta de calibración, con concentraciones comprendidas entre 3,75 y 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las diluciones se preparan por triplicado, para realizar la lectura de la absorbancia se sometió la muestra a una longitud de 410 nm de acuerdo a la metodología anteriormente descrita. Los cálculos de las diluciones se presentan en la siguiente tabla.

Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	V glicina (μL)	V H₂O destilada (μL)	V Total (μL)
C1 = 3,75	25	975	1000
C2 = 7,5	50	950	1000
C3 = 15	100	800	1000
C4 = 37,5	250	750	1000
C5 = 75	500	500	1000

Anexo 19. Determinación de la curva estándar Trolox (ABTS)

Con la finalidad de determinar la capacidad antioxidante por la metodología del ABTS en el hidrolizado proteico de los subproductos de la trucha arcoíris se elaboró la curva estándar a partir de trolox con una concentración de 1000 $\mu\text{mol}/\text{L}$, pesando 0,002503 g de trolox y se enrasa con metanol al 80% hasta un volumen final de 10mL. A partir de esta solución madre, se preparan los distintos puntos que integrarán la recta de calibración, con concentraciones comprendidas entre 100 y 500 μM . Las diluciones se preparan por triplicado, para realizar la lectura de la absorbancia se sometió la muestra a una longitud de 734 nm de acuerdo a la metodología anteriormente descrita. Los cálculos de las diluciones se presentan en la siguiente tabla.

Concentración (μM)	V trolox (μL)	V Metanol 80% (μL)	V Total (μL)
C1 = 100	500	4500	5000
C2 = 200	1000	4000	5000
C3 = 300	1500	3500	5000
C4 = 400	2000	3000	5000
C5 = 500	2500	2500	5000

Anexo 20. Determinación de la curva estándar Trolox (DPPH)

Con la finalidad de determinar la capacidad antioxidante por la metodología del DPPH en el hidrolizado proteico de los subproductos de la trucha arcoíris se elaboró la curva estándar a partir de trolox con una concentración de 2 mM, pesando 0,0023 g de trolox y se enrasa con metanol hasta un volumen final de 100 mL. A partir de esta solución madre, se preparan los distintos puntos que integrarán la recta de calibración, con concentraciones comprendidas entre 50 y 1000 μM . Las diluciones se preparan por triplicado, para realizar la lectura de la absorbancia se sometió la muestra a una longitud de 515 nm de acuerdo a la metodología anteriormente descrita. Los cálculos de las diluciones se presentan en la siguiente tabla.

Concentración (μM)	V trolox (μL)	V Metanol (μL)	V Total (μL)
C1 = 50	125	4875	5000
C2 = 100	250	4750	5000
C3 = 500	1250	3750	5000
C5 = 1000	2500	2500	5000