

**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS PRESENTES EN
SUBPRODUCTOS DE LA TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*),
CULTIVADA EN SILVIA-CAUCA**

LINA FERNANDA RESTREPO BUESAQUILLO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA
EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2016**

**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS PRESENTES EN
SUBPRODUCTOS DE LA TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*),
CULTIVADA EN SILVIA-CAUCA**

LINA FERNANDA RESTREPO BUESAQUILLO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Químico

Director:

Ph.D. RICARDO BENÍTEZ BENÍTEZ

Grupo de Investigación QPN

Departamento de Química

Universidad del Cauca

Co- Director

M.Sc. JOSE LUIS HOYOS CONCHA

Grupo de Investigación ASUBAGROIN

Departamento de Ingeniería Agroindustrial

Universidad del Cauca

Asesor:

Quím. EDIER GAVIRIA ACOSTA

Grupo de Investigación ASUBAGROIN

Departamento de Ingeniería Agroindustrial

Universidad del Cauca

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA
EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN, 2016**

Nota de aceptación

Director _____

Ricardo Benítez Benítez, Ph.D.

Jurado _____

René Zúñiga Rengifo, Mg.

Jurado _____

Clara Inés Hurtado Sánchez, Mg.

Popayán, 2 de Septiembre del 2016

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y guiar mi camino.

A mis padres: Juan Carlos Restrepo y Mónica Buesaquillo, por su lucha diaria para poder brindarme lo mejor, por regalarme todo su amor, por confiar en mis capacidades e impulsarme a ser mejor cada día.

A mis abuelos: Víctor Restrepo y Cecilia Serna, por el acompañamiento que han tenido durante toda mi vida, inculcándome valores que me han permitido crecer como persona.

A mi hermana Karen por ser mi compañera de aventuras.

A mis abuelos maternos, Joaquín y Teresa, tíos, primos y demás familiares, muchas gracias por darme su apoyo incondicional.

A Jair Robles por compartir gran parte de su tiempo a mi lado.

A mi director de tesis el profesor Ricardo Benítez, por el tiempo dedicado y el asesoramiento.

A mi co-director José Luis Hoyos Concha, por sus conocimientos y por el apoyo.

A Edier Gaviria por el asesoramiento y por ayudarme en la realización de la tesis.

Al grupo de trabajo ASUBAGROIN, por la gran acogida que tuve, por ser ejemplo de unión y trabajo en equipo.

A mis amigas Diana, Marcela, Carolay, Yeniffer, Eymi, por ser mis compañeras en el transcurso de la carrera, compartiendo agradables momentos.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GENERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO	16
3.1	ACUICULTURA	16
3.2	TRUCHA ARCOÍRIS.....	16
3.2.1	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	17
3.2.2	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	17
3.2.3	ANÁLISIS PROXIMAL.....	18
3.2.4	VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS	18
3.3	SUBPRODUCTOS.....	23
3.3.1	DESCRIPCIÓN GENERAL	23
3.3.2	MANEJO AMBIENTAL	23
3.3.3	USOS	24
3.4	AISLADO PROTEICO.....	25
3.4.1	MÉTODOS DE OBTENCIÓN	25
3.5	HIDRÓLISIS.....	27
3.5.1	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	27
3.5.2	ENZIMAS	28
3.5.3	SUSTRATO.....	29
3.5.4	FACTORES QUE INFLUYEN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	29
3.5.5	HIDROLIZADO DE PROTEÍNAS	31
3.5.6	GRADO DE HIDRÓLISIS	31
3.6	ENZIMAS ENDÓGENAS	34
3.6.1	INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA ENDÓGENA.....	35
3.7	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	36
3.7.1	MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.....	36
3.8	DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS, MÉTODO PICO-TAG DE WATERS	37
4	METODOLOGÍA.....	39
4.1	DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROCESO	39
4.2	RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE VÍSCERAS DE TRUCHA	40

4.3	PROCESO DE HOMOGENIZACIÓN DE MATRIZ.....	41
4.4	ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MUESTRA.....	42
4.5	INACTIVACIÓN DE ENZIMAS ENDÓGENAS Y CARGA MICROBIANA POR TRATAMIENTO TÉRMICO, COCCION.....	42
4.5.1	DETERMINACIÓN DE A-AMINOÁCIDOS PARA PROCESO DE INACTIVACIÓN DE ENZIMAS ENDÓGENAS.....	43
4.5.2	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO A MUESTRAS DE VÍSCERAS DE TRUCHA	44
4.6	EXTRACCIÓN DE ACEITE DE MATRIZ DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS	45
4.7	TRATAMIENTO DE SECADO	46
4.7.1	EXTRACCIÓN DE ACEITE DE MATRIZ MÉTODO SOXHLET	46
4.8	MOLIENDA DE LA MUESTRA	46
4.9	ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MUESTRA MOLIDA.....	47
4.10	ENZIMA	47
4.11	DISEÑO EXPERIMENTAL DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS.....	48
4.12	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	49
4.13	DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS.....	50
4.14	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS	51
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
5.1	ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MUESTRA.....	54
5.2	CURVA ESTÁNDAR DE L-LEUCINA	55
5.3	ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE PROTAMEX™	56
5.4	TRATAMIENTO TÉRMICO, INACTIVACIÓN DE ENZIMAS ENDÓGENAS.....	58
5.5	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO A MUESTRAS DE VÍSCERAS DE TRUCHA.....	60
5.6	ANÁLISIS PROXIMAL DEL AISLADO PROTEICO	61
5.7	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	63
5.7.1	ANÁLISIS ANOVA.....	64
5.7.2	DIAGRAMA DE PARETO.....	65
5.7.3	DIAGRAMA DE EFECTOS PRINCIPALES.....	67
5.7.4	GRÁFICA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA	67
5.7.5	VALORES ÓPTIMOS.....	68
5.8	SEGUIMIENTO DE LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS EN EL TIEMPO	70

5.9	COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS.....	71
6	CONCLUSIONES.....	78
7	BIBLIOGRAFÍA	79

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación Taxonómica.....	18
Tabla 2. Análisis proximal de trucha arcoíris entera.....	18
Tabla 3. Clasificación internacional de las enzimas	28
Tabla 4. Características de algunas proteasas comerciales	28
Tabla 5. Proteasas más importantes en peces, con sus respectivas características	35
Tabla 6. Tipo de inactivación de enzimas endógenas y sus características	36
Tabla 7. Análisis proximal de vísceras de trucha.	42
Tabla 8. Tratamiento térmico a muestras de subproductos.....	43
Tabla 9. Tratamientos efectuados para el procesamiento de vísceras de trucha Arcoíris.	45
Tabla 10. Factores del diseño experimental.....	48
Tabla 11. Diseño experimental.....	49
Tabla 12. Análisis proximal de vísceras de trucha licuadas.	54
Tabla 13. Curva de calibración de l-leucina.....	55
Tabla 14. Promedio de la concentración de leucina respecto al tiempo.....	56
Tabla 15. Determinación de la actividad en los diferentes tratamientos térmicos.	58
Tabla 16. Recuento de unidades formadoras de colonia presentes en muestras de vísceras de trucha arcoíris sometidas a diferentes tratamientos.....	61
Tabla 17. Análisis proximal del aislado proteico.....	62
Tabla 18. Diseño experimental.....	63
Tabla 19. Análisis ANOVA.....	64
Tabla 20. Valores óptimos para el grado de hidrólisis.....	68
Tabla 21. Composición de aminoácidos en vísceras de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	71
Tabla 22. Composición de aminoácidos en aislado protéico.....	72
Tabla 23. Composición de aminoácidos en el hidrolizado a condiciones óptimas.	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	17
Figura 2. Branquias	19
Figura 3. Corazón.....	20
Figura 4. Hígado y páncreas	20
Figura 5. Estómago	21
Figura 6. Bazo.....	21
Figura 7. Intestino.....	22
Figura 8. Subproductos de la actividad piscícola.	23
Figura 9. Metodología de obtención de un aislado proteico a nivel industrial	26
Figura 10. Metodología de obtención de un aislado proteico a nivel de laboratorio	26
Figura 11. Esquema de reacción TNBS.	33
Figura 12. Reacción de ftalaldehído y aminoácidos libres en presencia de mercaptoetanol.....	34
Figura 13. Diagrama de proceso	39
Figura 14. Proceso de recolección y posterior eviscerado	40
Figura 15. Proceso de homogenización de matriz	42
Figura 16. Montaje experimental inactivación de enzimas endógenas.	43
Figura 17. Tratamiento de secado.....	46
Figura 18. Proceso de molienda.....	47
Figura 19. Montaje experimental hidrólisis enzimática	50
Figura 20. Curva estándar de l-leucina.	56
Figura 21. Actividad enzimática de protamex.....	57
Figura 22. Diagrama de Pareto estandarizado.....	66
Figura 23. Diagrama de efectos principales	67
Figura 24. Grafica de superficie de respuesta.....	68
Figura 25. Seguimiento de la reacción de hidrólisis en el tiempo.....	70
Figura 26. Aminograma aislado proteico.....	72
Figura 27. Aminograma del hidrolizado obtenido a condiciones óptimas.....	74
Figura 28. Aminoácidos con tendencia a aumentar la concentración.	75
Figura 29. Comparación de aminoácidos.....	76
Figura 30. Comparación de aminoácidos que disminuyen su concentración.....	76

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Bitácora del muestreador	90
Anexo 2. Recuento microbiológico	91

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Recuento de unidades formadoras de colonias.....	45
Ecuación 2. Determinación del grado de hidrólisis.....	51

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

C	Carbono
D	Desviación estándar
DT	Desviación estándar total
DH	Grado de hidrólisis
ENN	Extracto no nitrogenado
H₂O	Agua
Leu	Leucina
N	Nitrógeno
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH₂	Amino
nm	Nanómetros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
OPA	o-ftalaldehído
ppm	Partes por millón
RSM	Método de superficie de respuesta
Rpm	Revoluciones por minuto
TNBS	Ácido Trinitrobencenosulfónico
UA	Unidades Anson
µg	Microgramo
µL	Microlitro
w/w	Porcentaje peso a peso

RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la optimización del proceso de hidrólisis enzimática de proteínas presentes en subproductos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), por medio del método de superficie de respuesta. Se encontró que estos desechos son buena fuente de proteína y lípidos con valores de 27,27 y 69,16% respectivamente, el porcentaje de aminoácidos esenciales fue superior al reportado por varios autores incluso para filetes de pescado. Los subproductos contienen enzimas presentes en el tracto digestivo además de algunos microorganismos, estos factores se eliminaron por medio de un tratamiento de inactivación a 65 °C durante 30 minutos; el procesamiento de la muestra hasta la obtención del producto hidrolizado, condujo a varias etapas como: homogenización, deshumificación, eliminación del extracto etéreo. El aislado proteico, resultante es el sustrato que se utilizó para la realización del proceso de hidrólisis. Para la optimización de la hidrólisis enzimática, se empleó la enzima Protamex™ y se desarrolló un diseño central compuesto 2³, con características: ortogonal y rotable, empleando como factores experimentales: tiempo, relación enzima/sustrato y temperatura, encontrando que los valores óptimos fueron 3,81 horas, 9,7% y 33,87 °C respectivamente, para un grado de hidrólisis de 67%. Esta investigación se realizó con el fin de buscar un valor agregado a estos subproductos que son considerados desperdicios de la producción piscícola, dado que los hidrolizados obtenidos podrían ser empleados como suplementos alimenticios, fuente de nitrógeno, entre otros, generando una alternativa para su disposición.

Palabras clave: Hidrólisis de proteína, aislado protéico, método de superficie de respuesta, inactivación enzimática, protamex.

1 INTRODUCCIÓN

La industria del pescado es una importante fuente económica para una serie de países en todo el mundo, se estima que mil millones de personas dependen de la producción, el procesamiento y el comercio de peces para su subsistencia (Oosterveer, 2008). En Colombia la actividad piscícola, está representada principalmente por la producción de: Tilapia, Cachama y Trucha; Esta última ha tenido un desarrollo importante durante los últimos años, con una producción estimada de 103.198 toneladas para el año 2015 (Mican, 2016).

En la obtención del producto final (filete congelado o pescado eviscerado), se generan subproductos como piel, huesos, vísceras y escamas que representan un alto porcentaje (50–70 %) del peso total de la materia prima (Dekkers et al., 2011; Bougateg et al., 2010), los cuales no reciben tratamientos adecuados para su disposición, generando problemas de contaminación a nivel de suelo y fuentes hídricas (Roslan, Yunos, Abdullah, & Kamal, 2014).

Se han estudiado métodos como el ensilaje, para dar manejo y aprovechamiento a estos residuos que son fuente de ácidos grasos polinsaturados, polisacáridos, minerales, vitaminas, antioxidantes, proteínas y enzimas (Chalamaiah et al., 2011), que por su composición podrían ser transformados en sustancias de alto valor comercial, tales como: aceite, hidrolizados (aminoácidos, péptidos), enzimas, piensos, fertilizantes, colágeno, harina, entre otros (Goosen, De Wet, & Gorgens, 2014a; Ovissipour et al., 2009; Aspino, Cuerno & Eijsink, 2005). La importancia de la proteína de origen piscícola radica en que presenta un valor nutricional, funcional y metabólico significativo, debido a la presencia de aminoácidos esenciales, reportándose para la producción de componentes bioactivos (Goosen et al., 2014a).

La hidrólisis proteica se convierte en una alternativa que podría contribuir a la disminución en el impacto ambiental, además de generar valor agregado al material, y consiste en el rompimiento de enlaces peptídicos, que da como resultado péptidos o aminoácidos libres, existen tres métodos de hidrólisis que son: ácida, alcalina y enzimática; la última reportada, presenta ventajas en comparación con las otras metodologías dado que no es destructiva y existe un control de los productos a obtener; Este proceso se realiza por acción de enzimas proteolíticas endógenas o exógenas (Borghesi et al., 2008). Las enzimas endógenas procedentes de vísceras de pescado, presentan su mayor actividad cuando el pH se reduce a valores cercanos a cuatro (Bello, 1997), por la adición de ácidos principalmente fórmico, acético, propanoico y sulfúrico (ensilaje químico), o por efecto de la producción in situ de ácido

láctico generado por las bacterias lácticas (BAL) a partir de una fuente de carbono (ensilaje biológico) (Ramírez, 2009). El pH ácido cercano a cuatro, se utiliza además, para evitar la descomposición del producto por la acción de los microorganismos (Contreras, 2009); La incorporación de enzimas exógenas (ensilaje enzimático) al medio de reacción, podría hacer el proceso hidrolítico más regulable y reproducible, en comparación con los otros tipos de ensilajes, debido a que se puede tener dominio de varios factores, como el pH, el tiempo, la relación enzima/sustrato y la temperatura (Nilsang et al., 2005; Liaset et al., 2000), lo cual permite controlar el grado de hidrólisis de la reacción y la producción de hidrolizados con diferentes propiedades y aplicaciones.

Estos hidrolizados se han producido y caracterizado a partir de varias fuentes, por ejemplo vísceras de: pez gato asiático (*Clarias macrocephalus*) (Klomklao, Kishimura & Benjakul, 2013), pargo (*Lutjanus vita*) (Khantaphant, Benjakul, & Kishimura, 2011), tiburón punta negra (*Carcharhinus limbatus*) (Kittiphattanabawon et al., 2012). El uso y las propiedades químicas de los productos son consecuencia directa de su composición de aminoácidos y del perfil de peso molecular. Un nivel alto de aminoácidos libres se cree que mejora la palatabilidad y propiedades nutricionales, mientras que la presencia de péptidos de mayor peso molecular podría mejorar las propiedades tecnofuncionales (Benítez et al., 2008).

Los productos hidrolizados además se utilizan como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas enterales con destino a la alimentación infantil y/o adultos con desordenes estomacales o problemas en la mucosa intestinal; Estas dietas se diseñan para ser absorbidas en el intestino sin una digestión previa en el estómago. Tanto la solubilidad en un amplio rango de pH, como el valor nutritivo de los hidrolizados de proteína, los convierte en una opción para producir sustitutos de leche (lactoreemplazadores) para animales destetados y como ingrediente de las formulas nutritivas para consumir como bebidas, siempre y cuando no se vea afectado el sabor (Suarez, 2010; Neklyudov, Ivankin, & Berdutina, 2000). En otras aplicaciones se encuentra una investigación realizada por Opheim et al. (2016), quien pone en consideración que la inclusión en un 10% de proteína hidrolizada de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) a las dietas de iniciación en pollos de engorde mejora el rendimiento de canal, en comparación con las dietas tradicionales, también se utiliza como fuente de nitrógeno eficaz en medios de crecimiento microbiano (Guerard et al., 2001).

Además de estos usos, los hidrolizados de proteínas también son considerados como fuentes de péptidos biológicamente activos. Los llamados "péptidos bioactivos" que pueden afectar a muchas funciones fisiológicas del cuerpo, mostrando capacidad antioxidantes (Sabeena et al., 2014), antimicrobiana (Schwarz et al., 2016), antitrombótica, antihipertensiva (Kim & Wijesekara, 2010). La optimización por medio

del método de superficie de respuesta de los parámetros de hidrólisis, ha sido ampliamente utilizado por varios autores (Shikha et al., 2016; Nilsang et al., 2005; Slizyté, Rustad & Storro. 2005), para obtener los valores de grado de hidrólisis que se ajusten a la aplicación deseada.

En este sentido, el siguiente trabajo se presenta como una alternativa para el uso y aprovechamiento de subproductos de la industria piscícola, en particular de las vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), logrando la optimización del proceso de hidrólisis enzimática bajo parámetros controlados, con el fin de establecer las bases que lleven a su posible incorporación en la alimentación animal, o a la obtención de compuestos bioactivos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar la hidrólisis enzimática de la proteína presente en vísceras de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Determinar la preparación de matriz para la hidrólisis enzimática de proteínas presentes en vísceras de trucha arcoíris.

2.2.2 Optimizar el grado de hidrólisis en vísceras de la trucha arcoíris, empleando como factores temperatura, tiempo y cantidad de enzima.

3 ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

3.1 ACUICULTURA

La acuicultura se define como el cultivo de organismos acuáticos, incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas, la cual se puede implementar en aguas marítimas o continentales, donde el hombre interviene en el proceso de crianza (siembra, alimentación, protección de los depredadores etc.) para aumentar la producción (Montaña, 2009).

Colombia es un país tropical que cuenta con gran variedad de cuencas hidrográficas que lo posicionan en un lugar destacado en recursos hídricos en el mundo (Esquivel et al., 2014; Mojica et al., 2012). Cuenta con los índices más altos en biodiversidad y una amplia variedad de peces (Mojica et al., 2012). Los diferentes pisos térmicos y las características climáticas estables en todo el año, al igual que su ubicación continental bañada por dos océanos y su vasta red fluvial, ofrecen un amplio potencial para el desarrollo de la acuicultura (Salazar, 2001).

Los productos pesqueros que genera Colombia se destinan en un 85% para el consumo humano, el 14,5% para uso industrial en la producción de piensos y otros productos, y el 0,5% restante son peces ornamentales y semilla para la acuicultura.

3.2 TRUCHA ARCOÍRIS

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) es un pez resistente y fácil de desovar, de crecimiento rápido, tolerante a una amplia gama de ambientes y manipulaciones, nativa de la costa este del pacífico, presenta cuerpo de forma alargada, aleta adiposa presente, usualmente con borde negro. Coloración azul a verde oliva sobre una banda rosada a lo largo de la línea lateral y plateada por debajo de ella. Lomo, costados, cabeza y aletas cubiertas con pequeños puntos negros. La coloración varía con el hábitat, tamaño, y condición sexual, se alimentan de larvas, insectos de superficie, crustáceos y peces pequeños, por lo cual se le debe suministrar un alimento rico en proteína, preferiblemente proteína animal (FAO, 2005).

La temperatura y disponibilidad de alimento influyen el crecimiento y la maduración de la trucha arcoíris, haciendo que la edad de madurez varíe; aunque por lo general es 3-4 años, esto debido a que la especie puede soportar amplios rangos de variación de temperatura (0-27 °C), pero el desove

y crecimiento ocurren en una gama más estrecha (9-14 °C). La temperatura óptima del agua para el cultivo de trucha arco iris está por debajo de 21 °C (FAO, 2005).

En cuanto al sistema de producción de la trucha arcoíris, el monocultivo es la práctica más común y los sistemas intensivos son considerados necesarios en la mayoría de las situaciones, para hacer la operación económicamente atractiva, además de hacer reversión sexual a hembras porque tienen mayor rendimiento de canal (Programa de información de especies acuáticas *Oncorhynchus mykiss*).



Figura 1. Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), (Imagen tomada de Camacho et al. 2000)

3.2.1 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (figura 1), originaria de la costa este de los Estados Unidos, llega a Colombia en el año de 1939 y desde allí hasta la fecha se ha creado más de 87 granjas industriales dedicadas a la Truchicultura de alta producción. Hoy en día esta especie ocupa el cuarto renglón en importancia en la acuicultura comercial, precedida de la tilapia (*Oreochromis*), el camarón (*Litopenaeus vannamei*) y cachama (*Piaractus*). (Sistema de información de precios y mercados)

3.2.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La clasificación taxonómica se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación Taxonómica (Rosado & Erazo, 2005).

Reino	Animal
Clase	Osteichthyes
Orden	Salmoniformes
Familia	Salmonidae
Género	Oncorhynchus
Especie	<i>Mykiss</i>
Nombre Científico	Oncorhynchus mykiss

3.2.3 ANÁLISIS PROXIMAL

En la tabla 2 se muestra el análisis proximal de la trucha arcoíris entera, realizada por Osorio y colaboradores en el 2013, se evidencia alto contenido de proteína y grasa.

Tabla 2. Análisis proximal de trucha arcoíris entera (Osorio, Wills & Muñoz, 2013).

Componente	Entero %
Humedad	72,14±0,01
Proteína	18,88±0,04
Grasa	8,18±0,04
Cenizas	1,27±0,03

3.2.4 VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS

Las vísceras de trucha arcoíris constan de branquias, esófago, corazón, hígado, páncreas, estómago, bazo, ciegos pilóricos, intestino.

3.2.4.1 Branquias

Las branquias (figura 2) son un órgano multifuncional especializado en funciones como el intercambio respiratorio, la osmorregulación, la eliminación de productos de desecho del metabolismo del nitrógeno y la regulación del equilibrio ácido-base (Girard & Payan, 1980). Posee una gran área irrigada lo que junto a una corta

distancia entre sangre y agua les facilita esos intercambios. Esto implica que las branquias son la principal vía de absorción de compuestos en disolución (Martínez, 1996). Están compuestas de finos filamentos cubiertos por una delgada membrana epidérmica, que corresponden a filamentos branquiales, branquioespinas y arco branquial.



Figura 2. Branquias. Fotografía: <http://www.ugr.es/~zoologia/atlasac/trucha.swf>

3.2.4.2 Esófago

El esófago comunica la faringe con el estómago, siendo generalmente de paredes gruesas, en la gran mayoría de los peces, la longitud de este órgano es corta y ancha, con secreción de mucus en la vía de entrada al estómago (Ávila, Insuasty & Guevara, 2008).

3.2.4.3 Corazón

El corazón consta de cuatro cavidades y es responsable de la circulación de la sangre, que circula hacia las branquias para su oxigenación. El corazón (figura 3) está ubicado en la parte anterior de la cavidad celómica llamada pericardio e inmediatamente posterior a la región branquial (Mancini, 2002).



Figura 3. Corazón. Fotografía: <http://www.ugr.es/~zoologia/atlasac/trucha.swf>

3.2.4.4 Hígado y páncreas

El hígado (figura 4) en los peces presenta dos grandes lóbulos laterales (izquierdo y derecho), bien delimitados, y un pequeño lóbulo intermedio (cístico) que acoge a la vesícula biliar, este órgano suele ser voluminoso y realiza funciones tanto hepáticas como pancreáticas; es el órgano metabolizador por excelencia de todas las sustancias que le llegan por vía sanguínea (Torres, González & Peña, 2010). También actúa como acumulador de glucógeno, se encarga de la producción de bilis y de grasa (Ávila et al., 2008). Los peces tienen enzimas digestivas para romper carbohidratos (Carbohidrasas) y grasas (lipasas), las cuales se producen primariamente en el páncreas, aunque se pueden producir en la mucosa intestinal y en los ciegos pilóricos de algunas especies (Moyle & Cech, 2000).



Figura 4. Hígado y páncreas. Fotografía: <http://www.ugr.es/~zoologia/atlasac/trucha.swf>

3.2.4.5 Estómago

El estómago (figura 5) en la trucha arcoíris tiene forma de “U”, es de gran tamaño con una parte curva. En los salmónidos, el alimento en el estómago se desmenuza realmente por acción de ácidos, enzimas digestivas y por acción trituradora de las paredes del estómago, donde las glándulas de la mucosa gástrica secretan ácido clorhídrico y pepsinógeno (precursor de la pepsina) para la digestión de las proteínas; el primero crea un ambiente ácido (pH entre 2 y 4) para la óptima actividad de la pepsina, alrededor de este órgano hay una serie de estructuras que conforman los ciegos pilóricos, los que se hallan rodeados generalmente por tejido adiposo blanco, salvo en situaciones de ayuno (Mancini, 2002).



Figura 5. Estómago. Fotografía: <http://www.ugr.es/~zoologia/atlasac/trucha.swf>

3.2.4.6 Bazo

En el bazo se presenta una tonalidad y forma variable, se suele situar próximo al estómago. Su color es rojo oscuro (figura 6) y estructuralmente no presenta separación entre las pulpas esplénicas roja y blanca, pudiendo presentar centros agregados de macrófagos cargados de melanina y hemosiderina (Cano, Ayala & López, 2016).



Figura 6. Bazo. Fotografía: <http://www.ugr.es/~zoologia/atlasac/trucha.swf>

3.2.4.7 Ciegos pilóricos

Se definen como proyecciones del tubo digestivo, sencillas o con ramificaciones, extendidas a partir del píloro del estómago o de la parte más craneal del intestino, con los que pueden quedar comunicados de forma independiente o mediante un orificio común. La mucosa está provista de numerosos pliegues con glándulas secretoras de enzimas (lactasa, sacarasa, lipasa) que intervienen en la digestión de las grasas. También se les atribuye un papel en la absorción de los alimentos ya digeridos, al ampliar la superficie del tracto intestinal (Cano et al., 2016). Los ciegos pilóricos se extienden desde donde termina el estómago hasta donde comienza el intestino (Ringo et al., 2003), y su función es incrementar la superficie de absorción digestiva y presenta un pH de 7.0 (Ringo et al., 2003).

3.2.4.8 Intestino

Se dispone a modo de tubo entre el píloro y el ano (figura 7). Es relativamente corto en carnívoros y más largo en herbívoros. Puede ser dividido en cuatro partes: ciegos pilóricos, intestino anterior o craneal, posterior o caudal y recto. Después de la hidrólisis preliminar de las proteínas en el estómago, en el intestino se realiza la hidrólisis completa de las proteínas a péptidos y aminoácidos, por la acción de la tripsina, quimiotripsina y aminopeptidasa en el intestino medio y posterior, donde hay un ambiente alcalino (Moyle & Cech, 2000).



Figura 7. Intestino. Fotografía: <http://www.ugr.es/~zoologia/atlasac/trucha.swf>

3.3 SUBPRODUCTOS

3.3.1 DESCRIPCIÓN GENERAL

El término subproducto hace referencia a un producto remanente de un proceso principal, al cual en la mayoría de los casos no se le da uso. En la acuicultura la generación de la mayor cantidad de subproductos se da con la consecución del producto final, específicamente en el caso de la trucha donde los residuos generados en la obtención del filete son de 50 a 70% del peso total del animal correspondientes a huesos, piel, escamas, vísceras (figura 8) (Silva et al., 2014).

Los subproductos de la actividad piscícola son fuente valiosa de proteínas digeribles de calidad nutricional, la mayoría de estos tienen diferentes usos con buenas propiedades nutricionales y funcionales.

Las vísceras de pescado generados durante el procesamiento son una fuente potencial de enzimas, tales como proteasas que pueden tener algunas propiedades únicas para aplicaciones industriales (Klomklao et al., 2010a).



Figura 8. Subproductos de la actividad piscícola.

3.3.2 MANEJO AMBIENTAL

En Europa existe legislación aplicable a los subproductos de la pesca, esta difiere en función de que sean o no destinados al consumo humano. El Reglamento (CE) nº 1069/2009 establece normas en materia de salud pública y salud animal

aplicables a los subproductos animales y los productos derivados, con el fin de prevenir y reducir al mínimo los riesgos para la salud pública y la salud animal; se permite la obtención de harina, aceite de pescado destinados a la alimentación animal, entre otros (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente en España, 2012).

En Colombia existen granjas y establecimientos piscícolas que no cuentan con Planes de Manejo Ambiental (PMA) que les permitan implementar acciones ambientales de prevención, mitigación, control, compensación, recuperación y corrección. Muchas otras cuentan con PMA pero no implementan este tipo de acciones con todo el rigor, mientras que otras cuentan con los PMA e implementan acciones ambientales pero éstas sólo se limitan a la disposición de los residuos en forma de compostaje, de conformidad con la normatividad que reglamenta la actividad (Bohórquez, 2015).

Los procesos de compostaje actualmente se utilizan como una forma de recuperación de subproductos, ya que los residuos orgánicos se pueden convertir, por microorganismos, en un compuesto estabilizado rico en nutrientes que pueden ser utilizados como fertilizante. El compostaje es un proceso aeróbico controlado de degradación de la materia orgánica en la que se generan vapor de agua, gases, lixiviados y el compost final (Lopes et al., 2015), aunque el exceso de subproductos depositados en el suelo puede generar problemas de contaminación ambiental, ya que la producción de los mismos se realiza en grandes cantidades.

En el Departamento del Cauca el grupo de investigación ASUBAGROIN, ha formulado un proyecto denominado ALPEZ, el cual busca desarrollar e implementar tecnologías para el aprovechamiento integral de los subproductos generados por la actividad piscícola en especies como: trucha y tilapia, con el objetivo no sólo de dar un valor agregado, sino también de fortalecer la capacidad científica y tecnológica de sus investigadores para una integración de los sectores científico y productivo. Existen otras investigaciones en curso en el país para dar manejo a los subproductos de la industria piscícola, como es el caso de “Fortalecimiento de la cadena piscícola con asociatividad, reactivación productiva, calidad y valor agregado”, ejecutado en el departamento del Tolima (Bohórquez, 2015).

3.3.3 USOS

Los subproductos de pescado se han utilizado para la obtención de una extensa variedad de productos, tales como: la quitina, el quitosano, colágeno, gelatina,

ácidos grasos poliinsaturados Omega 3, taurina, creatina, proteínas anticongelantes, enzimas, sulfato de condroitina, la harina de pescado y aceite (Omura & Inagaki, 2000 , Shahidi, Janak & Kamil, 2001 ,Baziwane & He, 2003 , Lignot et al., 2003 , Evans &Fletcher, 2004 , Blanco et al., 2007 , Bae et al., 2008 y Alonso et al., 2010).

3.4 AISLADO PROTEICO

El aislado proteico se realiza con el fin de generar el mayor provecho a la proteína nativa y consta de etapas de eliminación de interferentes, como extracción de aceite, deshumificación, que buscan obtener el mayor porcentaje de proteína; Entre las posibles aplicaciones, se destacan el uso como suplementos dietéticos (nutracéuticos), auxiliares tecnológicos e incluso como productos farmacéuticos.

3.4.1 MÉTODOS DE OBTENCIÓN

Se han utilizado diferentes formas de obtener un aislado proteico de origen animal y vegetal. Los correspondientes a fuentes vegetales, pueden ser obtenidos por solubilización alcalina seguidos de precipitación a punto isoeléctrico (PI) (Nicanor et al., 2001). Esta metodología es la más empleada en parte, por la facilidad de su implementación y por los altos rendimientos obtenidos de proteína, además permite la fácil separación de sustancias no proteicas tales como azúcares, fibra, lípidos y otros componentes no deseables en el producto final.

Los aislados proteicos de origen animal se pueden obtener a escala industrial o a nivel de laboratorio.

Escala industrial: Varios autores (Valencia et al., 2016; García et al., 2014), han reportado métodos para la preparación de aislados proteicos a nivel industrial, utilizando equipos que permiten procesar mayor cantidad de muestra, un ejemplo de este proceso se presenta en la figura 9.

Recolección	<ul style="list-style-type: none"> • Visceras transportadas en hielo.
Inactivación enzimática	<ul style="list-style-type: none"> • Condiciones: 40°C, 30 minutos
Extracción de aceite	<ul style="list-style-type: none"> • Prensa eléctrica ESP-K, hasta alcanzar 150 bar
Homogenización	<ul style="list-style-type: none"> • Torta de prensado se muele en cortador SK-3
Almacenamiento	<ul style="list-style-type: none"> • Congela el producto cortado a -20°C. Obtención del Aislado proteico

Figura 9. Metodología de obtención de un aislado proteico a nivel industrial (García et al., 2014).

Nivel de laboratorio: El aislado proteico obtenido a este nivel generalmente obtiene mayores concentraciones de proteína por que los tratamientos son más específicos, un ejemplo se encuentra en la (figura 10) (Wald et al., 2016; Vannabun et al., 2014; Bhaskar et al., 2008).

Recolección	<ul style="list-style-type: none"> • Vísceras transportadas en hielo • Limpieza con agua destilada proporción 4:1
Inactivación enzimática	<ul style="list-style-type: none"> • Condición: 60°C, 30 minutos • Procesos de homogenización
Extracción de aceite	<ul style="list-style-type: none"> • Centrifugación 12000 rpm por 15 minutos • Soxhlet por 2 horas
Deshumificación	<ul style="list-style-type: none"> • Secado de muestras 60 °C por 6 horas • Homogenización en molino
Almacenamiento	<ul style="list-style-type: none"> • En frascos ambar a -20 °C

Figura 10. Metodología de obtención de un aislado proteico a nivel de laboratorio (Wald et al., 2016).

3.5 HIDRÓLISIS

Los aminoácidos se unen covalentemente formando un enlace amida entre los grupos α -amino y α -carboxilo. Este enlace se denomina enlace peptídico, y los productos que se forman a partir de esta unión se llaman péptidos; la hidrólisis proteica, consiste en un rompimiento o *lisis* en el enlace peptídico, durante el transcurso de la reacción, las proteínas aumentan la solubilidad por la generación de péptidos con un tamaño molecular más pequeño y con más grupos amino y carboxilo ionizables (Panyam & Kilara, 1996).

Este proceso de hidrólisis se puede realizar de tres formas: 1) con la adición de ácidos, 2) bases o 3) enzimas. La primera se realiza bajo condiciones de HCl 6 N a 110°C durante más de 24 horas, y en el transcurso de la reacción se puede destruir el triptófano, a su vez, la segunda puede reducir aminoácidos como: cistina, arginina, treonina, serina, isoleucina, mientras que la tercera puede llevarse a cabo en condiciones suaves, y podría evitar los ambientes extremos requeridos por tratamientos químicos (Tavaro, 2013).

Además, el uso de enzimas permite un control más eficiente (Kristinsson & Rasco, 2000). Una ventaja que presenta este tipo de hidrólisis frente a la hidrólisis química es la mejora de las propiedades funcionales tales como: capacidad emulsionante y la textura, mostrando así una gran aplicabilidad en productos alimenticios (Tonon et al., 2016).

3.5.1 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática de proteínas se realiza con control de parámetros como pH, agitación, temperatura, relación enzima/sustrato. En general, el proceso implica una etapa de reacción seguido de una etapa de inactivación en un reactor discontinuo. Tanto las etapas de reacción e inactivación requieren la transferencia de calor. La etapa de reacción es generalmente operado a condiciones isotérmicas a una temperatura idealmente óptima; Mientras tanto, la etapa de inactivación se realiza en temperaturas que oscilan entre 75 ° C a 100 ° C durante 5 a 30 min (Valencia et al., 2016). Este proceso de hidrólisis, puede realizarse por medio de la acción proteolítica de enzimas endógenas (autólisis) o por medio de enzimas exógenas, sin embargo, las enzimas comerciales a veces se prefieren ya que permiten la hidrólisis controlada, permitiendo producir hidrolizados de proteínas con propiedades funcionales mejoradas (Kristinsson & Rasco, 2000a).

3.5.2 ENZIMAS

Las enzimas son catalizadores versátiles, eficientes y específicos, que actúan en todas las reacciones químicas que se producen en los organismos vivos (Rao et al., 2014), la clasificación internacional se encuentra en la tabla 3.

Tabla 3. Clasificación internacional de las enzimas (Mathews, 2002).

Número	Clase Reacción Catalizada	Características
1	Oxidorreductasas	Transferencia de electrones
2	Transferasas	Transferencia de grupos funcionales
3	Hidrolasas	Rotura de enlaces incorporando una molécula de agua
4	Liasas	Rotura de enlaces covalentes por adición o eliminación de grupos
5	Isomerasas	Reacciones de isomerización: transferencia de grupos dentro de la misma molécula
6	Ligasas	Formación de enlaces covalentes mediante reacciones de condensación

Dentro de las enzimas hidrolasas se encuentran las proteasas, estas a su vez pueden clasificarse según el origen, el centro de acción catalítica.

Origen: Animal, vegetal, bacteriano o fúngico.

Centro de acción catalítica: Endopeptidasas si rompen al azar el interior de las cadenas peptídicas, y exopeptidasas o peptidasas, si separan aminoácidos y dipéptidos de los extremos de las cadenas polipeptídicas (Guadix et al., 2000).

Tabla 4. Características de algunas proteasas comerciales (Guadix et al., 2000).

Enzima	Origen	pH	T (°C)
Alcalasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	7-9	30-65
Neutrasa	<i>Bacillus</i>	6-8	40-50
Protamex	<i>Bacillus</i>	5,5-7,5	35-60
Corolase	<i>Oryzae</i>	6-9	35-45
Bromelina	Vegetal (piña)	4-9	20-65
Papaína	Vegetal (papaya)	6-8	40-75
Ficina	Látex de Ficus	5-8	

Algunas proteasas comerciales se muestran en la tabla 4, autores como (Annadurai et al., 2012 , Aspino et al., 2005 , Ghorbel et al., 2005 y Souissi et al., 2007) han utilizado enzimas como: papaína, Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, Protamex, para la obtención de hidrolizados protéicos a partir de subproductos de pescado.

3.5.3 SUSTRATO

Los sustratos utilizados para el proceso de hidrólisis pueden ser de origen animal o vegetal. Para la elección de una fuente proteínica adecuada debe tenerse en cuenta el uso que vaya a tener el hidrolizado, así como el valor agregado del producto final con respecto al sustrato inicial (Benítez et al., 2008). Por ejemplo, para la obtención de hidrolizados con propiedades gelificantes y emulsificantes se suelen emplear colágeno y gelatina por su capacidad para formar geles transparentes (Guadix et al., 2000).

Origen vegetal: Los más usados son las proteínas de soja, trigo y arroz, principalmente en países desarrollados.

Origen animal: Se emplean proteínas del pescado, principalmente en países orientales, como Japón o Corea. También se han aprovechado las proteínas de residuos cárnicos como tendones o huesos (Benítez et al., 2008).

3.5.4 FACTORES QUE INFLUYEN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

3.5.4.1 Efecto del pH

En el proceso de hidrólisis enzimática el efecto del pH es importante dado que la actividad de las enzimas depende fuertemente de la concentración de iones hidronio del medio, y esto afecta el grado de ionización de los aminoácidos de la proteína, incluyendo a los del sitio activo, del sustrato (en caso de ser ionizable), o del complejo enzima-sustrato; de hecho el pH influye en la estructura tridimensional de la proteína y a su vez, sobre la afinidad que tenga la enzima por el sustrato (Badui, 2006).

Una vez iniciada la reacción de hidrólisis se van generando las interacciones que llevan al rompimiento de la proteína y con ello va cambiando el pH de la solución,

debido a la formación de grupos aminos nuevos, los cuales son capaces de liberar o aceptar protones, dependiendo del pH de la hidrólisis (Benítez et al., 2008), por esta razón, debe tenerse control sobre este parámetro, para ello, se podría utilizar un sistema buffer o realizarse monitoreando el pH de la reacción cada cierto tiempo, adicionando base diluida para contrarrestar cambios en el mismo y mantener a un valor constante en el cual se tenga la eficiencia optima de la enzima.

3.5.4.2 Efecto de la temperatura

La temperatura afecta la actividad enzimática debido a que incrementa la energía cinética de las moléculas, incrementándose a su vez, la rapidez de movimiento y, por ende, la frecuencia con la cual chocan, la combinación de choques frecuentes, energéticos y productivos, aumenta el índice de reacción (Murray et al., 2013).

Cada enzima tiene un intervalo óptimo de temperatura en el cual logra su mayor actividad, para la mayoría de las proteasas está entre 30 y 45 °C, sólo en el intervalo en que la enzima es estable y retiene su capacidad catalítica; en casos extremos, cuando el incremento es muy grande, se favorece la desnaturalización y consecuentemente la proteína pierde su capacidad; Algunas enzimas se inactivan por encima de 60 °C, a esta temperatura la energía introducida en el sistema sobrepasa la energía de las fuerzas que mantienen la estructura activa de la misma (Badui, 2006).

3.5.4.3 Efecto del tiempo

El efecto del tiempo en la hidrólisis enzimática no influye en la velocidad de reacción, dado que este parámetro solamente determina el grado final de hidrólisis.

3.5.4.4 Efecto de la relación enzima/sustrato [E/S]

La relación enzima/sustrato es importante en el proceso de hidrólisis enzimática debido a que la eficiencia de la enzima es mayor cuando la concentración de sustrato está en exceso en relación con la concentración de enzima. Esto se debe a que las colisiones “exitosas” con el reactivo son más frecuentes, asegurando así

que la mayor cantidad de enzima se encuentre activa, incrementándose la velocidad de reacción. En estas condiciones, el producto se obtiene a la máxima velocidad posible para la cantidad de enzima presente (Badui, 2006).

Por otra parte, la acción de una enzima a nivel industrial debe ser óptima tanto en términos de costo como de eficiencia catalítica, por lo que la reacción se debe llevar a cabo en la medida de lo posible a la máxima velocidad.

3.5.5 HIDROLIZADO DE PROTEÍNAS

Los hidrolizados de proteína son productos que presentan grandes beneficios dado que son fuente de aminoácidos esenciales, aumentan la digestibilidad de la proteína, mejoran las propiedades tecnofuncionales, lo cual les permite tener múltiples aplicaciones. Se pueden emplear en la industria dedicada a la alimentación animal, se reporta el uso de subproductos para obtener hidrolizados de proteína destinados a la formulación de dietas para pollos de engorde. La incorporación de hidrolizados en piensos destinados a la alimentación piscícola mejora la palatabilidad de la dieta en relación con el contenido de aminoácidos libre y péptidos con longitud de cadena corta (Khosravi et al., 2015).

3.5.6 GRADO DE HIDRÓLISIS

El grado de hidrólisis GH, representa la proporción de enlaces peptídicos hidrolizados sobre el número total de enlaces, considerándose un parámetro fundamental para el seguimiento y control de las reacciones de hidrólisis de proteínas (Benítez et al., 2008).

Existen diferentes métodos para calcular el GH basados en la determinación de nitrógeno soluble después de realizada la precipitación de la proteína con un solvente adecuado, la determinación de los grupos amino libres y la determinación por pH-estático, que consiste en la valoración del protón liberado después de generarse la ruptura del enlace peptídico.

Los valores que se obtienen de GH, dan una señal del posible uso que tendrían los hidrolizados. Un hidrolizado con un GH entre 1-10% se considera que podría mejorar las propiedades tecnofuncionales, mientras que un GH mayor al 10%, podría ser empleado en la alimentación especializada, como suplemento dietético o dieta médica ya que presenta características como: elevada solubilidad y mayor

absorción gastrointestinal. Además, el GH influye en las propiedades biológicas de los péptidos generados durante la hidrólisis debido a que afecta la composición de aminoácidos, así como el tamaño o estructura de los péptidos (Balti et al., 2011, Klompong et al., 2007 y Souissi et al., 2007).

Se han realizado innumerables estudios en los cuales se determina el grado de hidrólisis; Autores como Shahid y Naczk. (1995), emplearon un método de superficie de respuesta en la hidrólisis enzimática de residuos de Capelin (*Mollotus villosus*) y reportaron un GH de 22% a 60°C; En investigaciones realizadas por Gbogouri et al. (2004), en la hidrólisis enzimática de cabezas de salmón utilizando el método de superficie de respuesta, encontraron valores de grado de hidrólisis en el rango de (11,5 – 17,3%).

Por su parte, Sathivel et al. (2005) encontraron valores de *GH* de 15% empleando Alcalasa en la hidrólisis enzimática de cabezas de salmón rojo (*Onchorhynchus nerka*); (Ovissipour et al., 2000), alcanzaron un *GH* de 16% a 55°C en la hidrólisis de cabezas de atún (*Thunnus olbacens*).

3.5.6.1 MÉTODOS

Existen varios métodos con los cuales se pueden determinar los grupos α -amino libres producto de hidrólisis de proteína los cuales varían de acuerdo con las características del reactivo empleado.

Entre los métodos colorimétricos se encuentran: valoración con ninhidrina, ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS), OPA (Benítez et al., 2008).

Valoración con ninhidrina: Técnica antigua, de gran sensibilidad, que presenta larga duración de los ensayos e interferencias como el amonio, lo cual la hace poco útil como método de valoración.

Valoración con ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS): Basado en la reacción de los grupos α - amino con el 2,4,6-ácido trinitrobencenosulfónico, para formar un compuesto cromóforo que tiene un punto máximo de absorbancia a 410 nm (Spellmana et al., 2003); Buena sensibilidad y reproducibilidad.

El esquema de la reacción se muestra a continuación (figura 11):

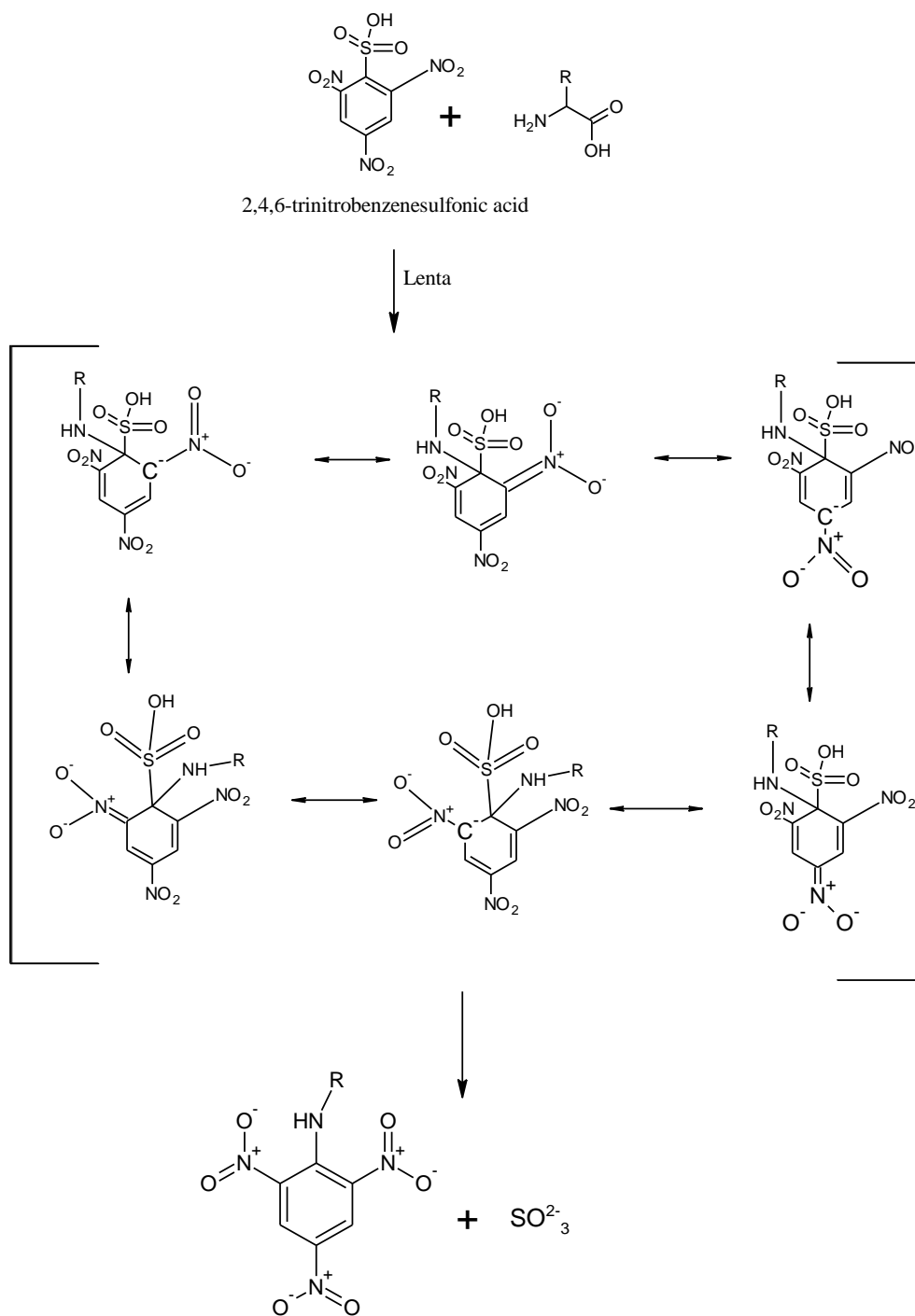


Figura 11. Esquema de reacción TNBS.

Se presenta una reacción de sustitución nucleofílica aromática por parte del aminoácido sobre el anillo aromático, donde el par electrónico libre del nitrógeno

actúa como nucleófilo, el ácido 2,4,6 trinitrobencensulfónico presenta grupos fuertemente electro atrayentes como el NO_2 y el SO_3^{2-} que activan el anillo por efectos inducidos, inicialmente se genera el ataque nucleofílico al anillo para generar el carbanión, las estructuras resonantes (híbridos de estructura) muestran como se estabiliza el carbanión, debido a los grupos que atraen electrones, los cuales tienden a neutralizar la carga negativa, de igual forma, la atracción electrónica estabiliza el estado de transición y la reacción se acelera, para dar lugar a la etapa de eliminación del ion sulfito y formación del producto de sustitución, que es un compuesto cromóforo que puede ser detectado a una longitud de onda de 410nm. El final de la reacción se da con adición de Na_2SO_3 , el cual se encuentra en exceso y por principio de Le Chatelier al incrementar un producto, el sistema lo consumirá parcialmente, favoreciendo el sentido inverso de la reacción.

Valoración con o-ftalaldehído (OPA): Basado en la reacción de los α -aminoácidos con el reactivo o-ftalaldehído en presencia de mercaptoetanol y condiciones alcalinas generando derivados o compuestos con máximo de absorbancia de 340 nm; entre los inconvenientes del método se destacan la poca estabilidad del reactivo, además de no reaccionar con prolina y parcialmente con cisteína (Guadix et al., 2000).

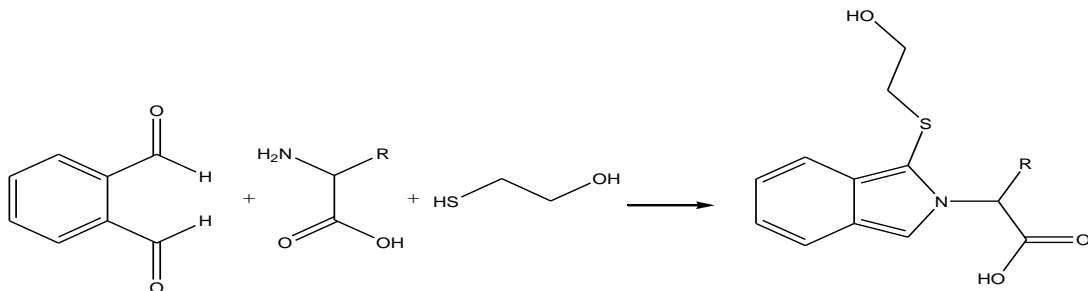


Figura 12. Reacción de o-ftalaldehído y aminoácidos libres en presencia de mercaptoetanol.

3.6 ENZIMAS ENDÓGENAS

En los peces se distinguen tres principales categorías de enzimas que participan en el proceso digestivo: (1). Enzimas de membrana, (2). Enzimas de las células del tracto digestivo, y (3). Enzimas secretadas por órganos como el páncreas y el estómago, dichas enzimas son producidas siempre como zimógenos o pro-

enzimas y su activación se genera por la escisión de un péptido que cambia la posición del sitio activo (Román, 2012).

Las proteasas digestivas más importantes en peces (tabla 5) son las siguientes: pepsina, tripsina, quimiotripsina, colagenasa, elastasa, carboxipeptidasa A y colipasa (Guillaume et al., 2001; Simpson, 2000; Haard, 1990), las anteriores se caracterizan por contener un residuo de serina, a excepción de la pepsina, que es una proteasa aspártica.

Tabla 5. Proteasas más importantes en peces, con sus respectivas características. (Benítez et al., 2008) * Tomado con modificaciones.

Tipo de proteasa endógena	Nombre	Temperatura (°C)	Intervalo de pH
Serinproteasa	Tripsina	20-45	7-9
	Quimiotripsina	25-40	8-9
	Elastasa	20-40	6-8
Aspartato proteasas	Pepsina	17-35*	1-4
Metaloproteasas	Carboxipeptidasa A	22-45	7-8

3.6.1 INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA ENDÓGENA

La inactivación de enzimas endógenas, consiste en desnaturalizar enzimas para que estas no puedan seguir actuando sobre el sustrato, existen diferentes formas de inactivación que se ajustan dependiendo de la matriz.

Para las proteínas la desnaturalización indica que la estructuración se aleja de la forma nativa, debido a un importante cambio en su conformación tridimensional, producido por movimientos de los diferentes dominios de la proteína, que conlleva a un aumento de la entropía de las moléculas. El cambio conformacional al que se hace referencia indica pérdidas en estructuras secundaria, terciaria o cuaternaria, afectándose las interacciones no covalentes, sin modificarse la estructura primaria de la misma (Badui, 2006).

Existen diferentes formas de inactivar enzimas y estas son explicadas en la tabla 6.

Tabla 6. Tipo de inactivación de enzimas endógenas y sus características. (Badui, 2006) Tomado con modificaciones.

Tipo de inactivación	Características
Temperatura	Las enzimas presentan una temperatura óptima en la cual su actividad es máxima, la actividad de la enzima disminuye cuando se empieza alejar de ese rango de temperaturas. Se afecta la estabilidad de las interacciones no covalentes de la estructura tridimensional de la proteína.
pH	Cambios en el pH de la proteína puede generar modificaciones en su conformación debido a cambios en la ionización de las cadenas laterales cargadas, afectando el grado de ionización de los aminoácidos de la proteína, incluyendo a los del sitio activo, del sustrato, o del complejo enzima- sustrato.

El tratamiento de cocción se presenta como un método para la inactivación de enzimas endógenas y consiste en someter la materia prima a un calentamiento para provocar además de la inactivación que la grasa contenida se fluidifique y permita separarse con mayor facilidad (Wald et al., 2016).

3.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental es una herramienta utilizada para describir etapas que llevan a la identificación de factores que pueden influir en el resultado de un experimento, es útil para minimizar los efectos de los factores incontrolados.

En la consecución de un diseño experimental se implementa un análisis estadístico para separar y evaluar los efectos de los diversos factores implicados (Miller & Miller. 2002).

3.7.1 MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

El método de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar problemas en los que una

respuesta de interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo. El propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos. Este método permite conocer el funcionamiento de un sistema o proceso y encontrar las condiciones óptimas del mismo, permitiendo mejorar los resultados en cuanto a costo, tiempo, eficiencia, productividad (Ovissipour et al., 2009). La respuesta de un sistema depende de más de dos factores que son variables continuas, la relación entre la respuesta y los niveles de los dos factores se puede representar por una superficie tridimensional denominada superficie de respuesta (Miller & Miller, 2002).

3.8 DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS, MÉTODO PICO-TAG DE WATERS

El método PICO-TAG, es desarrollado por Waters Associates, para la determinación de aminoácidos libres. Se basa en la derivatización pre-columna de los aminoácidos con fenilisotiocianato (PITC), el cual reacciona con el aminoácido terminal de un péptido, formando una tiourea que se puede hidrolizar selectivamente en medio ácido. El péptido resultante contiene un aminoácido menos y puede ser objeto de una nueva reacción de degradación. A su vez, el aminoácido que se elimina de la cadena polipeptídica da lugar a una feniltiohidantoína sustituida, que es analizada por HPLC en fase reversa. Los PITC aminoácidos presentan un máximo de absorción a 254 nm. La columna que se utiliza es una Pico-Tag (C18), mantenida a 46 °C (Roca, Oliver & Rodríguez, 2003).

Los pasos del método son los siguientes:

Desproteización: Las muestras y patrones se mezclan con acetona fría para favorecer la precipitación de las proteínas. Las proteínas son separadas por centrifugación, y el sobrenadante libre de proteínas se puede conservar a -20 °C hasta su utilización (Roca et al., 2003).

Derivatización: Los aminoácidos son derivatizados con fenilisotiocianato a temperatura ambiente y pH básico.

Separación cromatográfica: Los aminoácidos previamente deshumificados se disuelven en un diluyente de muestra y se centrifugan para recoger el sobrenadante libre de partículas en suspensión que podrían afectar la columna. El proceso de separación tiene lugar a través de un gradiente de elución que va

desde una polaridad alta del eluyente a una polaridad baja, utilizando dos eluyentes de diferente polaridad que se van mezclados, de acuerdo al programa de elución. Los aminoácidos derivatizados son detectados por el detector ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm (Roca et al., 2003).

4 METODOLOGÍA

4.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL PROCESO

En la (figura 13), se observa el diagrama de obtención del aislado protéico, donde se muestran las etapas y análisis desarrollados.

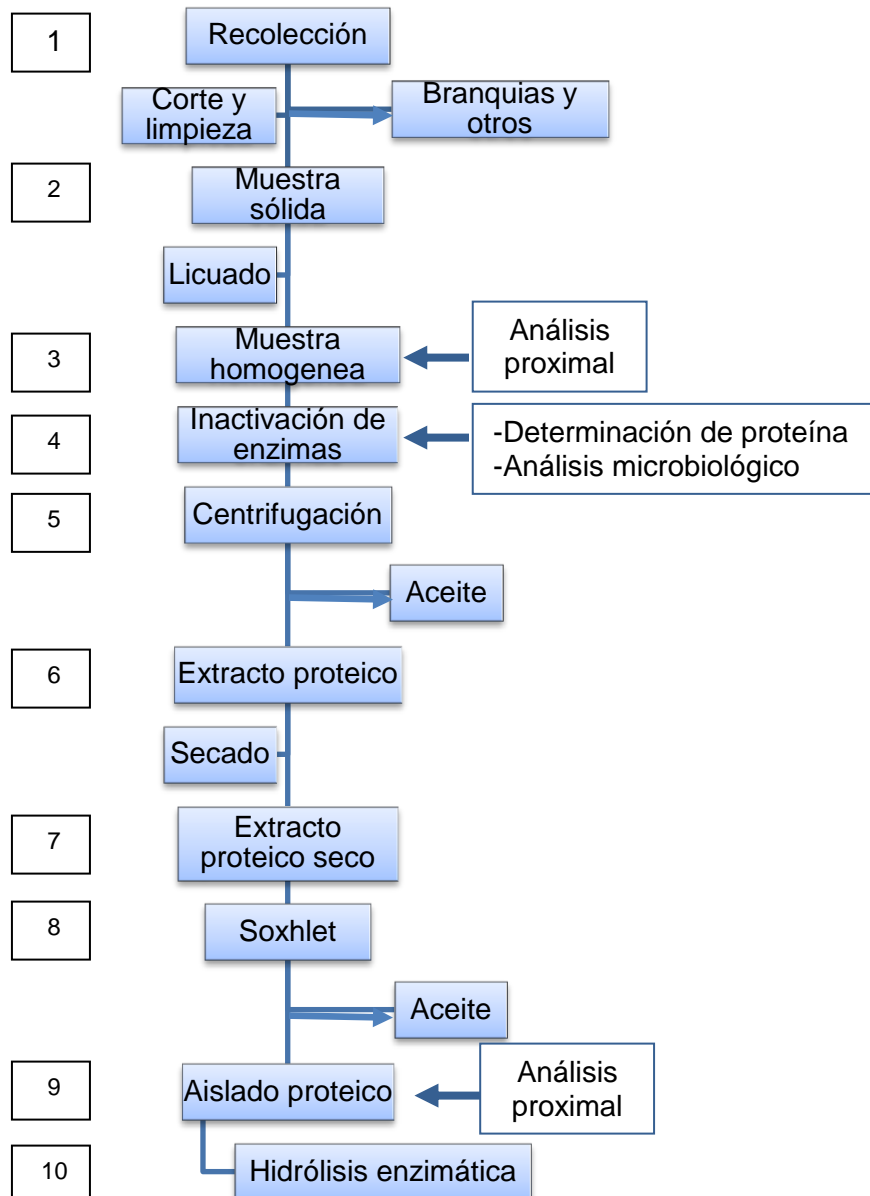


Figura 13. Diagrama de proceso

4.2 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE VÍSCERAS DE TRUCHA

Los subproductos de la trucha arcoíris se obtuvieron de la empresa Asociación Productora y Comercializadora de Productos Acuícolas y Agrícolas (APROPESCA), localizada en Silvia-Cauca, a los 2,37° latitud norte y 76,21° longitud oeste, se encuentra a 2527 m sobre el nivel del mar, y a una temperatura media de 15°C.

Las muestras se recolectaron después de realizado el proceso de evisceración de la trucha en fase de engorde, con un peso promedio de canal de 400 g, se almacenaron en un recipiente previamente desinfectado. El muestreo (figura 14) se realizó tomando las vísceras de trucha de un tamaño entre 30-35 cm aproximadamente, además se efectuó, asegurando que la materia tomada fuera representativa e idéntica a todo el conjunto, respecto a peso, talla, alimentación y etapa de crecimiento (Kechaou et al., 2009; Aspino et al., 2005; Ortega, 1998).



Figura 14. Proceso de recolección y posterior eviscerado, a. supervisión del

cultivo de trucha de un mismo lote, b. trucha recolectada llevada a recipientes y c. transportada de inmediato, d. recepción de las truchas e. sitio de proceso de eviscerado, f. y g. identificación de vísceras en condiciones óptimas, h. disposición en un recipiente.

Para lo anterior se creó una bitácora del muestreador donde se consignó las variables del proceso como el largo, alto, ancho y peso promedio de la trucha, etapa en la que fue recolectada, entre otras (ANEXO 1).

Las vísceras fueron transportadas de inmediato al laboratorio de biotecnología de la Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias, Vereda las Guacas, municipio de Popayán, Cauca, donde se realizó el desarrollo metodológico, las instalaciones son ubicadas a una altitud de 1850 msnm y a una temperatura promedio de 20°C. Las vísceras constaban de órganos como branquias, esófago, corazón, hígado, riñón, páncreas, bazo, estómago, ciegos pilóricos e intestino.

4.3 PROCESO DE HOMOGENIZACIÓN DE MATRIZ.

Se realizó un tratamiento de limpieza a las vísceras para eliminar materiales como piedras, residuos de alimento, entre otros; para ello se efectuó una incisión en los estómagos y se lavó su interior con agua destilada en proporción 1:4 p/p, descartándose con una espátula el alimento que no había sido digerido (Silva et al., 2014; Kechaou et al., 2009). Las branquias fueron retiradas mediante un corte manual, posterior a esto, se procedió a homogenizar la matriz por medio (figura 15) de un proceso de licuado (Slizyté et al., 2005), en una licuadora convencional, hasta obtener una pasta homogénea. Son procesadas alrededor de 500 g de vísceras, en condiciones de asepsia.

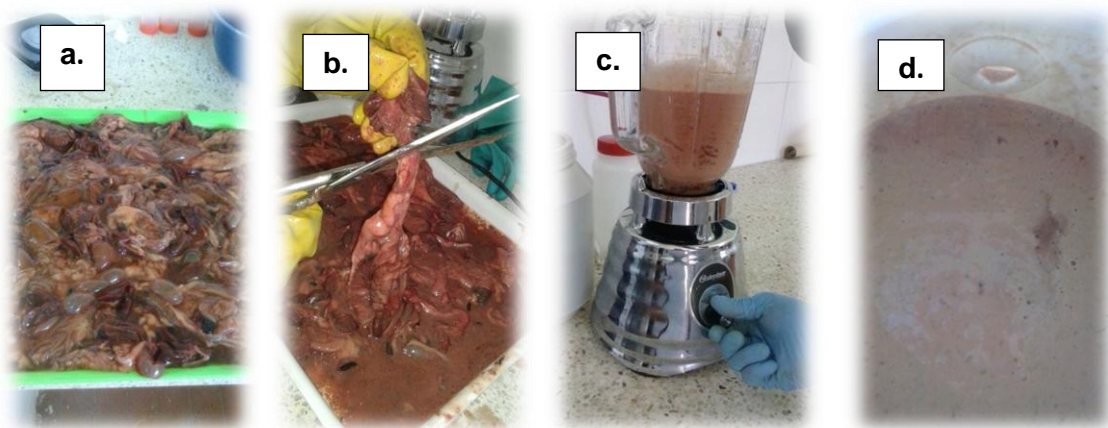


Figura 15. Proceso de homogenización de matriz. a. vísceras en estado inicial, b. corte de branquias, c. muestra licuada por 4 minutos y d. estado final del licuado.

4.4 ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MUESTRA

Se tomó una muestra compuesta del licuado obtenido y se realizó el análisis proximal bajo protocolos expresados en la tabla 7.

Tabla 7. Análisis proximal de vísceras de trucha.

Determinación	Descripción	Método
Humedad	Deshidratación a 100 – 105 °C en estufa a presión constante hasta peso constante	AOAC 950.43
Ceniza	Calcinación a 550 °C por 4 horas	AOAC 920.153
Extracto etéreo	Extracción Soxhlet por 4 horas	AOAC 991.36
Proteína bruta	Kjeldahl: Digestión ácida y destilación de nitrógeno (N x 6,25)	AOAC 968.06
Fibra bruta	Weende: Digestión ácido-base y calcinación	AOAC 962.09
Extracto no nitrogenado (ENN)	Por diferencia	

4.5 INACTIVACIÓN DE ENZIMAS ENDÓGENAS Y CARGA MICROBIANA POR TRATAMIENTO TÉRMICO, COCCION.

La inactivación por tratamiento térmico, se realizó para eliminar dos posibles interferentes en el proceso de hidrólisis que son: crecimiento de microorganismos patógenos y actividad de enzimas endógenas; Se evaluaron tres diferentes temperaturas de inactivación 65°C, 80°C y 94°C (Shikha et al., 2016), a diferentes tiempos $t_0=0$, $t_1=15$ y $t_2=30$ minutos (Slizyté et al., 2005; Guerard et al., 2002). El montaje experimental (figura 16) se efectuó en un baño termostatado, contabilizando el tiempo una vez la muestra alcanzara la temperatura de trabajo, con agitación manual. El factor de respuesta es la inactivación de enzimas endógenas, determinando la actividad residual por medio del método TNBS.

Los tratamientos efectuados son descritos en la tabla 8.

Tabla 8. Tratamiento térmico a muestras de subproductos.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
T0	-	-
T1	65	15
T2	65	30
T3	80	15
T4	80	30
T5	94	15
T6	94	30

Fuente: Este estudio

4.5.1 DETERMINACIÓN DE α -AMINOÁCIDOS PARA PROCESO DE INACTIVACIÓN DE ENZIMAS ENDÓGENAS

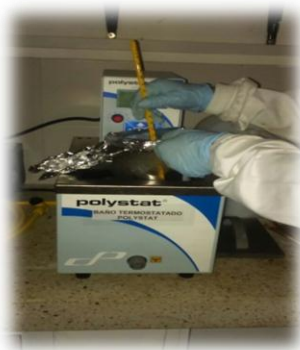


Figura 16. Montaje experimental inactivación de enzimas endógenas.

Se pesaron $80,0002 \pm 0,0001$ g del licuado de vísceras de trucha en erlenmeyer de 300 mL, el erlenmeyer que contenía la muestra fue llevado a un baño termostático (figura 16) donde se contabilizaba el tiempo de inactivación una vez se alcanzara la temperatura requerida. Con el fin de determinar la liberación de aminoácidos en la muestra por causa de la actividad de enzimas endógenas, se realizó lectura de TNBS en cada muestra a diferentes tiempos, tomando como T₀ el tiempo después del tratamiento térmico, T₁ a los 30 minutos y T₂ a los 60 minutos.

Para la determinación de α -aminoácidos, se pesaron 4 g de muestra inactivada, se agregaron 6 mL de buffer pH 7,0 (relación 2:3), se realizó vortex por 10 segundos, se llevó a una centrifuga refrigerada (Z 326 K, Hermle Labortechnik GmbH) a 12000 rpm por 10 minutos, se filtraron y del sobrenadante se tomó 128 μ L para la realización del método TNBS.

- **CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO TNBS**

La curva de calibración se realizó de la siguiente manera:

Se pesaron $2,0000 \pm 0,0001$ g de α -Leucina en una balanza analítica (Kern AES 220-4) y se secaron a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dos horas; Se pesaron $0,0659 \pm 0,0001$ g de α -leucina previamente secos, se diluyeron en agua destilada y se aforaron a 50 mL con lo que se obtuvo una concentración de 10 mM/L (solución patrón).

Las concentraciones de los patrones para la curva fueron 0,6, 1,2, 1,8, 3,0, 4,2, 6,0 mM/L.

El reactivo TNBS se prepara a una concentración 0.01%, para lo cual se tomaron 50 μL de reactivo TNBS al 5% y se aforan en balón de 25 mL.

Se realizaron parámetros de reproducibilidad, repetibilidad durante 5 días.

- **MÉTODO TNBS**

En tubos ámbar con tapón de rosca y capacidad de 10 mL, se midieron 128 μL de cada una de las diluciones más 2 mL de buffer fosfato (0,2 M, pH 8,2) y 1 mL de TNBS al 0,01%. La mezcla fue agitada en Vortex Mixer (M65825), durante 10 segundos. Pasado este tiempo, los tubos se llevaron a incubación en el Baño termostataado Polystat 2W7 a 50°C durante 30 min bajo la oscuridad. La reacción fue detenida con la adición de 2 mL de sulfito de sodio 0,1 M. Las mezclas fueron enfriadas a temperatura ambiente durante 15 min y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro UV-Visible (UV-1800, SHIMADZU CORPORATION), a una longitud de 410 nm (Nissen, 2002).

4.5.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO A MUESTRAS DE VÍSCERAS DE TRUCHA

Se realizó el recuento microbiológico a muestras de vísceras de trucha arcoíris, los tratamientos efectuados se describen en la tabla 9.

Tabla 9. Tratamientos efectuados para el procesamiento de vísceras de trucha Arcoíris.

Tratamiento	Descripción tratamiento
T1	Vísceras sin procesar
T2	Licuado de vísceras
T3	Licuado de vísceras después de cocción a 65°C por 15 minutos
T4	Licuado de vísceras después de cocción a 65°C por 30 minutos
T5	Licuado de vísceras después de cocción a 80°C por 15 minutos
T6	Licuado de vísceras después de cocción a 80°C por 30 minutos
T7	Licuado de vísceras después de cocción a 94°C por 15 minutos
T8	Licuado de vísceras después de cocción a 94°C por 30 minutos

Se realizaron diluciones seriadas de la muestra de 10^{-1} hasta 10^{-6} . Para la dilución 10^{-1} se trabajó con un volumen de muestra de 10mL en 90mL de agua peptonada. Para las diluciones siguientes se utilizó un volumen de 1mL en 9mL de agua peptonada. Se realizó el recuento microbiano de mesófilos, bacterias ácido-lácticas y Hongos – levaduras, en los medios de cultivo selectivos PCA, MRS y YGC respectivamente.

El recuento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL) se realizó teniendo en cuenta la Norma Técnica Colombiana NTC 4458 basada en la ecuación 1:

$$UFC/mL = \frac{\sum C}{V(n1 + 0.1n2)d}$$

Ecuación 1. Recuento de unidades formadoras de colonias.
Dónde:

$\sum C$: Sumatoria de las colonias contadas en todas las cajas.

n1: número de cajas contadas en la primera dilución

n2: número de cajas contadas en la segunda dilución

V: volumen inoculado.

d: factor de dilución de la menor dilución.

4.6 EXTRACCIÓN DE ACEITE DE MATRIZ DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS

La muestra obtenida en el proceso de inactivación se llevó a centrifugación en una centrífuga marca HERMLE Z 306 a 12000 rpm, por 20 minutos, para esto se pesaron en tubos falcón 40 g de muestra; esta operación de separación de partículas sólidas por la acción de una fuerza centrífuga se realizó debido a la

diferencia de densidades entre la fase proteica y el extracto etéreo, la fracción proteica fue almacenada y la parte etérea se separó por decantación. El aceite recuperado se cuantificó por diferencia de peso (Oliveira et al., 2016; Slizyté et al., 2005).

4.7 TRATAMIENTO DE SECADO

Después de realizado el proceso de extracción mecánica de la parte etérea, se procedió a transferir la muestra a bandejas de forma uniforme, para el posterior secado a 65 °C por 12 horas, en un Horno Binder (ED series, 7201) (figura 17) (Vannabun et al, 2014).



Figura 17. Tratamiento de secado

4.7.1 EXTRACCIÓN DE ACEITE DE MATRIZ MÉTODO SOXHLET

Se desarrolló el método soxhlet, con el fin de obtener un mayor porcentaje de extracción de aceite, que permite aumentar el porcentaje de proteína en el aislado protéico, para ello, se sigue el protocolo con algunas modificaciones de la AOAC 991.36; Se pesaron los balones y las piedras de ebullición, posterior a ello se pesaron 200,00±0,01 g de la muestra seca en los cartuchos y se llevaron a la extracción empleando éter de petróleo como solvente por un tiempo de 5 horas. Finalizado el tiempo se pesaron los balones para obtener el porcentaje de extracción de la fracción etérea.

4.8 MOLIENDA DE LA MUESTRA

La muestra desengrasada y seca se llevó a un proceso de molienda (figura 18) en un molino mecánico (POLYMIX® PX-MFC 90 D Martillo o molino de corte), hasta

obtener partículas de textura fina, las cuales se pasaron por un tamiz de 2 mm de diámetro (Slizyté et al, 2005). En cada análisis se llevó a cabo el método de cuarteo con el fin tener una muestra homogénea y representativa. .

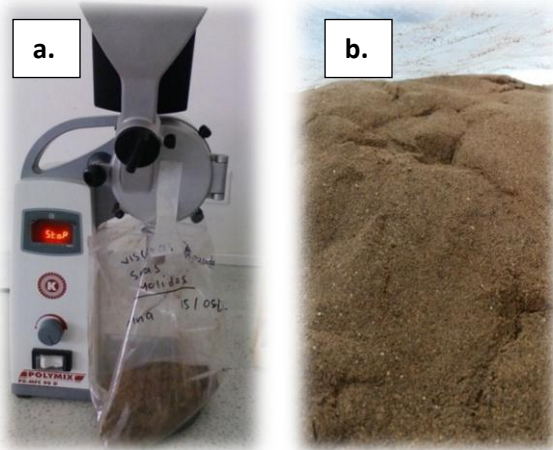


Figura 18. Proceso de molienda a. muestra molida por medio de un molino mecánico, b. muestra después de pasar por un tamiz de 2 mm de diámetro

4.9 ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MUESTRA MOLIDA

El análisis proximal de la muestra molida se realizó de acuerdo al protocolo descrito en el numeral 4.4.

4.10 ENZIMA

Se trabajó con la enzima PROTAMEX™ de Novozymes, con una actividad reportada de 1.5 UA/g (UA: Unidades Anson). Protamex es un complejo proteasa de *Bacillus* desarrollado para la hidrólisis de proteínas de alimentos. Su temperatura óptima de actividad está entre 35 y 60 °C, el pH entre 5.5 y 7.5. En contraste con muchas otras endoproteasas, Protamex no produce hidrolizados protéicos amargos incluso a altos grados de hidrólisis, además esta enzima es de calidad alimentaria dado a que es de origen microbiano y el organismo productor "*Bacillus*" es no patógeno (Batista et al., 2010).

Se realizaron ensayos para determinar la actividad enzimática inicial de la enzima Protamex, para lo cual se empleó una solución de proteína de soya al 1% diluida en buffer fosfato pH 6, de dicha solución se tomaron 5 mL y 0,5 mg de enzima, se

lleva a reacción enzimática a 40°C y en tiempos estipulados de 0, 10, 20 45, 60 min. Se determinó la actividad proteolítica por medio del método TNBS.

4.11 DISEÑO EXPERIMENTAL DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS

El diseño experimental del proceso de hidrólisis enzimática se realizó mediante el empleo de la metodología de superficie de respuesta (RSM), empleando un diseño central compuesto 2^3 , con características particulares de ortogonal y rotable, con puntos estrella y replicas en el punto central, usando el software Statgraphics® (STSC Inc. Rockville, Md, USA, versión plus 5.1), se emplearon tres factores que son temperatura, tiempo y relación enzima-sustrato, a dos niveles diferentes (-1,+1). La variable de respuesta del diseño propuesto fue el grado de hidrólisis (GH, %).

El pH se mantuvo constante y se ajustó a 7,0 con adición de base diluida. Cada ejecución después de la hidrólisis se terminó mediante la inactivación de la enzima a 80°C durante 15 minutos. (Batista et al., 2010; Guérard et al., 2001). El diseño optimizado fue validado a través de la réplica del punto donde se generaba el mayor grado de hidrólisis.

Los factores se encuentran expuestos en la tabla 10, donde la selección de los valores máximos y mínimos se basó en un estudio preliminar de hidrólisis enzimática, además de valores empleados por otros autores (Ennaas et al., 2015; Je et al., 2015).

Tabla 10. Factores del diseño experimental

Factor	Valor Máximo	Valor Mínimo
Temperatura	40 °C	60 °C
Relación de concentración Enzima/sustrato	3.0%(p/p)	8.0%(p/p)
Tiempo	12 h	36 h

Las unidades experimentales del diseño propuesto, se muestra en la tabla 11, generado por el software.

Tabla 11. Diseño experimental.

Muestra	Tiempo h	[E/S] %p/p	Temperatura °C
1	12,0	3,0	40,0
2	3,8	5,5	50,0
3	44,2	5,5	50,0
4	24,0	5,5	33,2
5	36,0	8,0	60,0
6	24,0	5,5	50,0
7	24,0	5,5	50,0
8	24,0	5,5	50,0
9	24,0	5,5	50,0
10	24,0	5,5	50,0
11	24,0	5,5	50,0
12	24,0	1,3	50,0
13	12,0	8,0	60,0
14	36,0	3,0	60,0
15	36,0	8,0	40,0
16	24,0	5,5	66,8
17	36,0	3,0	40,0
18	24,0	5,5	50,0
19	12,0	8,0	40,0
20	24,0	9,7	50,0
21	24,0	5,5	50,0
22	24,0	5,5	50,0
23	12,0	3,0	60,0

Los valores expuestos en la tabla 8 se encuentran discriminados de la siguiente forma: del diseño central compuesto 2^3 pertenecen 8 corridas, 9 corridas correspondientes a replicas en el punto central y 6 puntos estrella, que generan un total de 23 corridas realizadas de forma aleatoria.

4.12 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Se determinó inicialmente el contenido de proteína en la muestra después de todo el tratamiento realizado hasta la obtención del aislado proteico, este valor fue de 84,74%, para lo cual se empleó una solución al 10% de sustrato.

El proceso de hidrólisis enzimática de proteínas presentes en vísceras de trucha arcoíris, se realizó en un Shaker (Thermo scientific-MaxQ 4450), el cual permitió controlar temperatura y agitación; El montaje experimental constó de un erlenmeyer de 300 mL, en el cual se adicionaba 6,4905 g de aislado protéico y se llevó a un volumen de 50 mL con agua destilada, el pH inicial era aproximadamente de 5,5, se ajustó hasta llegar a pH= 7,0 con adición de base diluida (Je et al., 2015); Una vez se alcanzaba el pH de trabajo la muestra se llevó al Shaker para que alcanzara la temperatura necesaria para realizar el experimento, se efectuó control de temperatura con un termómetro cada 2 minutos, una vez se llegaba a la temperatura se adicionaba la enzima, medida de acuerdo a los requerimientos del diseño, el Shaker se empleó para una agitación de 100 rpm. El pH de la reacción era controlado con la adición de NaOH 0,1 N. Finalizado el tiempo de hidrólisis la muestra era inactivada a 80 °C por 15 minutos (Ovissipour et al., 2009). El montaje experimental se ilustra en la (figura 19).

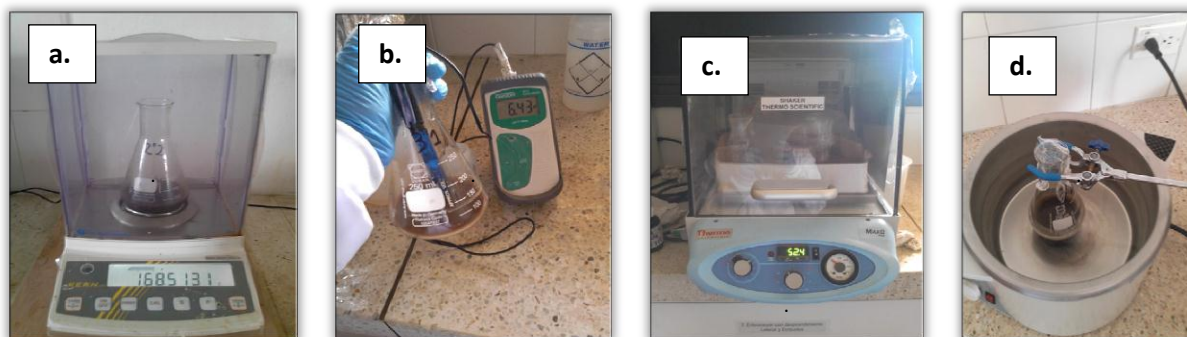


Figura 19. Montaje experimental hidrólisis enzimática. a. Pesaje de la muestra, b. control de pH, c. Shaker donde se llevaba a cabo el proceso de hidrólisis, d. inactivación de la enzima.

4.13 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

Para la determinación del grado de hidrólisis se realizó un tratamiento preliminar al hidrolizado que consistía en centrifugar a 4000 rpm por 12 minutos, para separación del precipitado con los péptidos de mayor tamaño, posteriormente se filtró y se volvió a realizar una centrifugación a 12000 rpm por 12 minutos a 4°C (Silva et al., 2014), el filtrado producto de la última centrifugación se utilizó para realizar las diluciones correspondientes 100 µL en 10 mL, estas diluciones son empleadas para la realización del método TNBS.

El grado de hidrólisis se calculó de acuerdo a la ecuación 2.

$$GH = \frac{h}{ht} * 100$$

Ecuación 2. Determinación del grado de hidrólisis.

Donde h es el total de mmol de leucina en cada hidrolizado y ht la cantidad de mmol de leucina en la muestra hidrolizada completamente, es decir la digestión con HCl 6N por 24 horas a 105 °C (Nilsang et al., 2005).

4.14 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS

El proceso se efectuó en el laboratorio QUANTAR S.A.S Cali-Colombia con la metodología Waters Pico Tag estandarizada.

El análisis de aminoácidos fue realizado por HPLC con columna en fase reversa, siguiendo el método PICO-TAG de Waters Corporation (1995), (AOAC 994.1210), por medio de la derivatización de los aminoácidos libres con fenilisotiocianato (PITC), a través de un cromatógrafo líquido de alta resolución, integrado a un detector UV, empleando una columna C18 Pico Tag. Los procedimientos para la cuantificación de aminoácidos, incluyen tratamiento de muestra, etapas de secado y derivatización, preparación de fase móvil y se explican a continuación:

Tratamiento de muestra: Se realizó hidrólisis ácida a la muestra con ácido clorhídrico 6N, durante 24 horas, a 110°C, posteriormente el ácido se evapora a sequedad.

Curva de calibración: La curva de aminoácidos se realizó con concentraciones de 4,2 µmol/L, 8,3 µmol/L, 12,5 µmol/L, 16,7 µmol/L y 20,8 µmol/L, preparadas en HCl 0,1 N.

Derivatización: Para el proceso de derivatización se preparó inicialmente el reactivo de EDMAN (reactivo derivatizante, PITC), mezclando etanol, agua, trietilamina y fenilisotiocianato en proporción 7:1:1:1 respectivamente, posterior a esto se adicionan 20 µL de este reactivo a la muestra previamente seca y se liofiliza durante 30 minutos.

Fases móviles: La primera fase móvil fue una mezcla de acetato de sodio 0,150M y acetonitrilo (16:1, v/v); La segunda fase móvil correspondía a una mezcla de Agua-acetonitrilo (0,6:1, v/v). *Solución diluyente Pico-Tag:* Solución de fosfato disódico y acetonitrilo (19:1, v/v).

A la muestra se le adiciona 600 μL de la solución diluyente Pico -Tag y se inyectan 5 μL de la muestra derivatizada, la separación de los aminoácidos se realizó en una columna C18 Waters Pico Tag (300x3, 9mm, 3 μm) fase reversa, a una velocidad de flujo de 1,0 mL/min, temperatura constante de 38°C, la identificación se realizó utilizando un detector ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el proceso de obtención del aislado proteico se realizaron múltiples tratamientos, inicialmente se pesaron $1500,00 \pm 0,01$ g de vísceras, en el paso 2 (figura 13), después de cortar las branquias y realizar procesos de lavado se obtuvieron $1221,60 \pm 0,01$ g de muestra, es decir se perdieron $278,40 \pm 0,01$ g que correspondía a sangre, alimento no digerido y branquias, las últimas mencionadas son retiradas por problemas en homogenización, dado a que están compuestas de tejido cartilaginoso y no pueden ser mezcladas completamente.

Fue importante extraerlas, debido a que presentaban un área de superficie amplia que estaba continuamente en contacto con el medio externo y por lo tanto se consideran como la ruta principal de absorción de contaminantes de fase acuosa (Playle, 1998). Pereira y colaboradores en el año 2010, realizaron un estudio para evaluar el contenido de Cu, Cr, Cd y Zn, seguidos por medio de biomarcadores, en el pescado lisa aurata, encontrando mayor concentración de estos metales en las branquias.

Los pasos siguientes 3 y 4 corresponden a la muestra homogénea procedente del licuado e inactivación de enzimas endógenas, en el paso 5 (extracción de aceite), se logró separar el 25% de aceite que corresponde a $501,37 \pm 0,01$ g, es decir que la fracción proteica hasta aquí fue de $720,29 \pm 0,01$ g, con esta última se continuó el tratamiento de secado, donde se obtienen $283,29 \pm 0,01$ g de muestra seca, perdiéndose $437,00 \pm 0,01$ g; finalmente se obtiene $274,80 \pm 0,01$ g de aislado proteico.

El rendimiento del proceso se calcula de la siguiente forma:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Valor obtenido}}{\text{Valor inicial}} \times 100$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{274,80}{1500,00} \times 100 = 18,32\%$$

El valor de 18,32%, es mayor al encontrado por Benito y Sampedro en el año 1977, quienes obtuvieron un rendimiento de proteína del 17,64% en musculo de pescado Jurel, realizando etapas de procesamiento similares a las expuestas en este estudio. No se encuentran reportes sobre porcentajes de rendimiento en la obtención de aislado proteico en vísceras.

5.1 ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MUESTRA

El análisis proximal del licuado de vísceras de trucha arcoíris se muestra en la tabla 12 donde se evidencia alto contenido de grasa 69,16%, humedad 60,67% y de proteína 27,27%. Un valor de humedad mayor al 30% favorece la proliferación de microorganismos, por lo tanto es necesario realizar una deshumificación en la muestra para extraer la mayor cantidad de agua del medio y así generar un aislado proteico que pueda ser estable en cuanto al crecimiento de microorganismos. Las características de composición: alto contenido en proteínas, grasas, humedad, favorecen el crecimiento bacteriano donde prácticamente todos los tipos de bacterias son capaces de crecer y deteriorar la materia prima (Martinez, 2003).

Los pasos siguientes (2 al 9), se realizaron con el fin de eliminar grandes interferentes en el proceso de hidrólisis enzimática como lo es el extracto etéreo, algunos autores reportan procesos hidrolíticos en los cuales altos contenidos de lípidos (10-30%), podrían formar complejos de proteínas-lípidos, estos complejos parecen ser más resistente a la descomposición proteolítica, que conduce a una cantidad reducida de aceite separado y un menor rendimiento del hidrolizado proteico (Slizyte et al., 2005), además de dificultar la acción de la enzima dado a que puede ser encapsulada o formar una emulsión que la deja inactiva.

Tabla 12. Análisis proximal de vísceras de trucha licuadas.

Determinación	Porcentaje
Humedad	60,67±0,13
Cenizas*	3,21±0,10
Proteína*	27,27±0,01
Grasa*	69,16±0,32
Fibra*	0,01±0,00
Carbohidratos*	0,32±0,00

**Los resultados son expresados en base seca*

Por otra parte, se han realizado investigaciones que buscan determinar la porción de materia prima en peces (correspondiente a: vísceras, piel, huesos y escamas), que es descartada y que genera pérdidas en el proceso de producción. García et al. (2004), realizaron un estudio para evaluar el rendimiento en canal de las formas en las que se comercializa la trucha arcoíris que son: trucha eviscerada (contiene cabeza, piel y espinas) y filete, para la primera mencionada obtuvieron un

rendimiento del 85,49%, es decir se está perdiendo por especie capturada el 14,51% correspondiente a vísceras, mientras que en la obtención del filete el rendimiento es del 53,14%, desperdiciándose el 46,86%; esta investigación demuestra el alto porcentaje de material que no es utilizado en la industria piscícola y que según el estudio realizado en la presente tesis tiene cantidades considerables de proteína y lípidos que podrían ser re-utilizados.

La FAO (1991) ha informado que normalmente el filete en los peces contiene 72% de agua, 19% de proteínas y 8% de grasa. Sin embargo, estos valores no son estáticos y por el contrario experimentan variaciones de acuerdo a los cambios ambientales y en relación con su edad, sexo, hábitat y estaciones (Nazrul & Razzaq, 2005), Perea y colaboradores (2008). Realizaron la determinación de proteína y grasa total al filete obtenido de cinco especies: trucha arco iris (*Onchorynchus mykiss*), tilapia roja (*Oreocliromis spp*), cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), bocachico (*Prochilodus reticulatus magdalenae*) y bagre (*Pseudoplatystoma faciatum*), encontrando valores de proteína entre 54,6-74,6% y una cantidad de grasa total que oscilaba entre 1,3- 27,0% (valores dados en base seca). Si se compara el aporte de proteína y grasa entre el filete y las vísceras de trucha arcoíris. Los resultados de la presente investigación muestran que las vísceras, tienen altos porcentajes de proteína (27,27%) y grasa (69,16%), que no son utilizados, siendo importante recuperarlos para generar un valor agregado, que podría tener un impacto positivo en las industrias piscícolas.

5.2 CURVA ESTÁNDAR DE L-LEUCINA

En la tabla 13, se describen los resultados de la curva de calibración de l-leucina, los cuales se procedieron a graficar con el fin de obtener la ecuación que describe la curva, por medio de esta ecuación se calcula la concentración de las muestras analizadas.

Tabla 13. Curva de calibración de l-leucina.

milimol- Leucina	Absorbancia 410 nm			\bar{x}	Desviación estándar \pm
	1	2	3		
0,6	0,054	0,058	0,058	0,056	3,5 ⁻⁶
1,2	0,094	0,093	0,094	0,093	2,2 ⁻⁰⁷

1,8	0,155	0,135	0,155	0,148	$8,8^{-05}$
3,0	0,244	0,238	0,243	0,241	$6,8^{-06}$
4,2	0,336	0,322	0,335	0,331	$4,0^{-05}$
6,0	0,415	0,436	0,435	0,428	$9,3^{-05}$

Al realizar la gráfica (figura 20) se obtiene una curva lineal descrita por la ecuación $Y=0,0708x+0,0185$ con un coeficiente de regresión lineal del 0,9935. La curva de l-leucina será empleada para posteriores cálculos por medio del método TNBS.

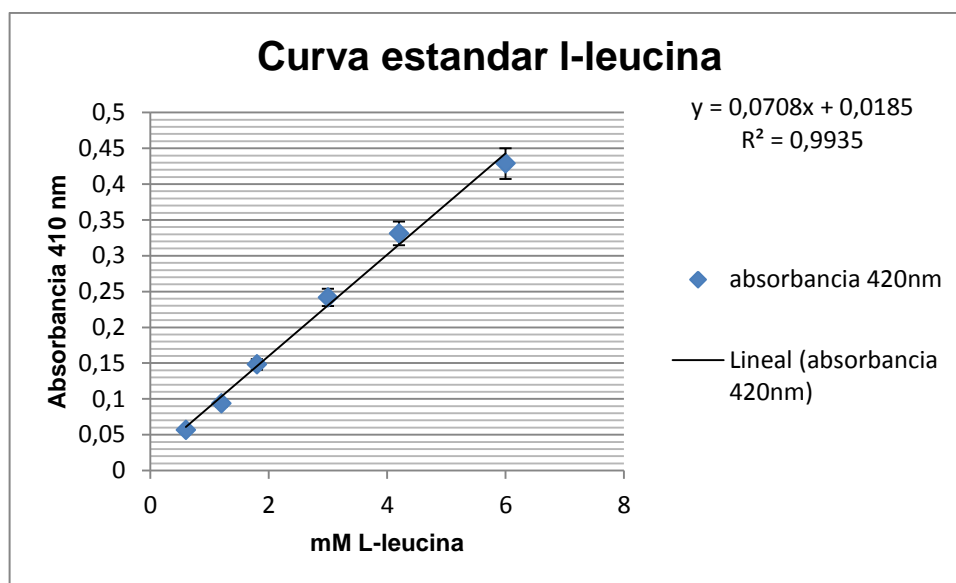


Figura 20. Curva estándar de l-leucina.

5.3 ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA DE PROTAMEX™

En la tabla 14 se muestra el promedio de la concentración de leucina con respecto al tiempo.

Tabla 14. Promedio de la concentración de leucina respecto al tiempo.

Tiempo min	<i>mg de leucina</i>			\bar{x}	Desviación estándar \pm
	1	2	3		
0	1,598	1,584	1,5345	1,592	0,007
10	11,814	11,804	11,798	11,806	0,007
20	16,253	16,236	16,243	16,237	0,008

45	46,863	46,875	46,860	46,866	0,007
65	61,993	61,779	61,877	61,873	0,107

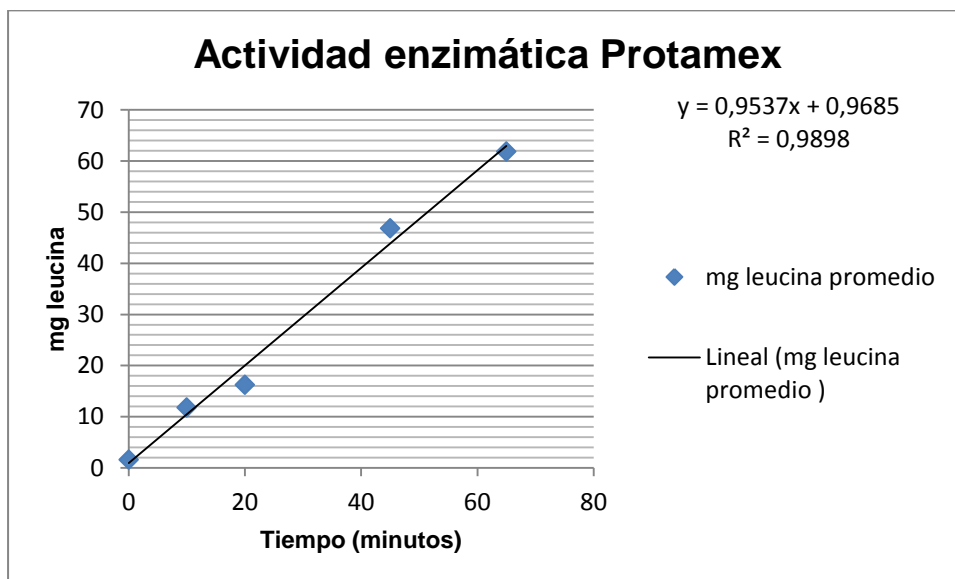


Figura 21. Actividad enzimática de Protamex.

La hidrólisis enzimática de la proteína de soja utilizando Protamex en condiciones óptimas (reportadas por el fabricante), libera aminoácidos al medio de reacción, entre ellos leucina que es el aminoácido con el cual se hace la cuantificación por el método TNBS, y muestra una tendencia lineal al aumento de la concentración de leucina durante el tiempo (Figura 21), la pendiente de la curva de tendencia muestra que se liberan 0,954 mg/min de leucina, valor cercano al reportado por el proveedor de 1.5 UA empleando como sustrato hemoglobina. La elección de la enzima para este trabajo se realizó teniendo en cuenta parámetros importantes en los hidrolizados, uno de ellos es la amargura, ya que, es el principal problema que afecta a la aceptabilidad sensorial del hidrolizado de proteína. (Adler-Nissen, 1984) reporta que enzimas como Flavourzyme™ y Protamex las cuales son una mezcla de enzimas endo y exo peptidasas, pueden minimizar la amargura en el producto hidrolizado, dicha amargura se debe a la exposición de cadenas laterales de aminoácidos hidrófobos. Los aminoácidos que crean un sabor amargo son valina, isoleucina, fenilalanina, triptófano y tirosina (Pedersen, 1994).

5.4 TRATAMIENTO TÉRMICO, INACTIVACIÓN DE ENZIMAS ENDÓGENAS.

El tratamiento térmico para la inactivación enzimática se realizó por medio de cocción, con ello se buscaba esterilizar, coagular proteínas y liberar los lípidos retenidos en la materia prima (Silva, 2003).

Los resultados de la inactivación de enzimas endógenas para cada tratamiento se muestran en la tabla 15, después de realizado el procedimiento de inactivación, se dejó la muestra durante 60 minutos, midiendo la actividad residual en el tiempo cero (finalizado el tratamiento), pasados 30 minutos y a los 60 minutos, con el fin de observar si las enzimas endógenas habían sido inactivadas de forma completa, se podría esperar que si el calentamiento fue efectivo, en el transcurso de 60 minutos la actividad medida por el método TNBS no debería aumentar, por ello se evaluó la velocidad de liberación de aminoácidos durante el tiempo estipulado, la respuesta negativa o inactividad se obtenía si la pendiente de la gráfica es ≤ 0 , y positiva si es ≥ 0 .

Los tratamientos no presentaron velocidad de liberación de mM leucina en el tiempo, evidenciando así que todos los tratamientos fueron efectivos en el momento de inactivar enzimas endógenas presente en las vísceras de trucha arcoíris, y por tanto que podría emplearse cualquier temperatura y tiempo de los antes mencionados.

Tabla 15. Determinación de la actividad en los diferentes tratamientos térmicos.

Tratamiento	Tiempo min	mmolLeu/gmuestra	Velocidad
65°15min T0	0,0	1,3	0,0
65°15min T1	30,0	1,4	
65°15min T2	60,0	1,3	
65°30min T0	0,0	1,5	0,0
65°30min T1	30,0	1,3	
65°30min T2	60,0	1,0	
80°15min T0	0,0	1,3	0,0
80°15min T1	30,0	1,3	
80°15min T2	60,0	1,1	
80°30min T0	0,0	1,3	0,0
80°30min T1	30,0	1,3	
80°30min T2	60,0	1,1	
94°15min T0	0,0	1,3	0,0
94°15min T1	30,0	1,2	

94°15min T2	60,0	1,1	
94°30min T0	0,0	1,1	0,0
94°30min T1	30,0	0,9	
94°30min T2	60,0	0,8	

Se escoge como un rango mínimo la temperatura de 65°C, debido a que cada enzima tiene un intervalo óptimo de temperatura en el cual logra la mayor actividad, para la mayoría de las enzimas endógenas está entre 30 y 45°C, y se inactiva a más de 60°C, a esta temperatura la energía introducida al sistema sobrepasa la energía de las fuerzas que mantienen la estructura activa de la enzima (Badui, 2006). Aunque la actividad catalítica de la enzima varía con la especie de procedencia. En los peces, por ejemplo las enzimas endógenas se han adaptado a operar eficazmente a bajas temperaturas del orden de 25-50°C, permitiendo ser inactivadas por encima de 50°C (Fennema, 1993).

Se llevó a experimentar con dos temperaturas adicionales que fueron 80°C y 94°C, a tiempos de 15 y 30 minutos, uno de los criterios de selección de la temperatura y tiempo de trabajo, fue poder generar el menor daño a la proteína nativa en el proceso de calentamiento, dado que la inactivación por calor de las enzimas endógenas puede dar lugar a la desnaturalización y consecuentemente la proteína pierde su capacidad nutricional, efecto que no se desea debido a que se quiere obtener un producto hidrolizados que genere valor agregado a la proteína. Según Mohr, cuando hay un incremento elevado en la temperatura, por largas fracciones de tiempo (mayor a 1 hora), podría haber mayor resistencia al ataque de proteasas, debido a las interacciones hidrófobas entre los péptidos o la auto-asociación de péptidos más grandes durante el calentamiento, reduciendo la capacidad de las enzimas para hidrolizar las proteínas, por tanto disminuyendo el rendimiento del hidrolizado. Autores como Opheim y colaboradores. (2015), encontraron una reducción en la eficiencia de la hidrólisis después del pretratamiento con temperaturas mayores a 80°C por 40 minutos, atribuida a cambios conformacionales en la estructura de la proteína o la formación de complejos que se hace resistente a la descomposición enzimática.

Vannabun et al. (2014) evaluaron el efecto de la temperatura y tiempo sobre la actividad de proteasas presentes en vísceras de bagre gigante (*Pangasianodon gigas*), encontrando que la temperatura y tiempo óptimo de inactivación era de 50°C durante 30 minutos.

Krogdahl et al. (2015), realizaron una incubación a 37°C de las enzimas tripsina y quimiotripsina provenientes de vísceras de salmón (*Salmon salar*), encontrando

que durante los primeros 30 minutos de incubación, se perdió alrededor del 55% de sus actividades. Después de 60 min de incubación, se perdía el 70% de las actividades enzimáticas; esta disminución de actividad a tiempos prolongados (60 minutos), podría deberse a la condición de temperatura escogida que es baja en comparación con otros estudios, por lo tanto se esperaría que incrementando la temperatura a 65°C durante 30 minutos, se perdiera aproximadamente el 100% de la actividad de las mismas.

En relación al criterio de selección establecido, se optó por utilizar 65°C y 30 minutos, para inactivar la carga enzimática, el valor escogido es mayor al utilizado por Slizyté et al. (2005), quienes realizaron un proceso de hidrólisis enzimática en vísceras de bacalao (*Gadus morhua*), donde efectuaron un calentamiento inicial a 50°C durante 23 minutos, con dos propósitos, para inactivar enzimas endógenas y para aumentar la cantidad de aceite separado, bajo estas condiciones, obtuvieron una separación de aceite en la materia prima del 51% y una inactivación enzimática eficaz.

Existen otras formas de inactivar enzimas endógenas, se descartó la inactivación por pH ya que, enzimas presentes en la trucha manejan niveles óptimos diferentes (tabla 6), por ejemplo la pepsina y la quimiotripsina con rangos de pH de 1-4 y 8-9 respectivamente, al realizar una variación de pH del medio una de ellas se encontrara activa y no se tendría control en el proceso de hidrólisis, además, si el ambiente en el que se encuentra la enzima no está a un pH extremo esta puede replegarse y regresar a su conformación y actividad original, es decir se puede re naturalizar.

Por otra parte, el proceso de autólisis dependiente de la acción de las enzimas endógenas, no involucra costos en cuanto a la adquisición de enzimas y el proceso es fácil de operar. Sin embargo, la digestión prolongada afecta a las propiedades funcionales de los hidrolizados y puede reducir la aplicación de los productos para el consumo humano. Con el fin de tener un control total de la reacción enzimática es necesario inactivar enzimas endógenas antes de realizar el proceso de hidrólisis.

5.5 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO A MUESTRAS DE VÍSCERAS DE TRUCHA

En la tabla 16, se presentan los resultados obtenidos del recuento microbiológico de muestras de vísceras de trucha arcoíris sometidas a diferentes tratamientos de cocción.

Tabla 16. Recuento de unidades formadoras de colonia presentes en muestras de vísceras de trucha arcoíris sometidas a diferentes tratamientos.

Tratamiento	UFC/mL		
	Mesofilos	Levaduras	Bacterias Acido Lácticas
T1	$1,85 \times 10^5$	$8,64 \times 10^4$	$7,50 \times 10^3$
T2	$1,05 \times 10^7$	$2,01 \times 10^5$	$1,15 \times 10^4$
T3	ND*	ND	ND
T4	ND	ND	ND
T5	ND	ND	ND
T6	ND	ND	ND
T7	ND	ND	ND
T8	ND	ND	ND

*ND: No Detectado

El análisis microbiológico muestra que todos los tratamientos generan una inactivación microbiana eficaz, y que por lo tanto podría emplearse cualquier tratamiento para inactivar microorganismos patógenos. En general la resistencia térmica de los microorganismos está relacionada con su temperatura óptima de crecimiento, los microorganismos mesófilos tienen la temperatura de crecimiento entre 20 y 35 °C, las bacterias, mohos y levaduras son también sensibles al calor.

Las vísceras procedentes de un pez saludable recién capturado son estériles, debido a que el sistema inmunológico del pez previene el crecimiento de bacterias patógenas. Cuando el pez muere, el sistema inmunológico colapsa y las bacterias proliferan libremente (Huss, 1999), es por esto que pasadas aproximadamente 4 horas del momento de realizar el eviscerado la carga microbiana en las vísceras es $1,85 \times 10^5$ UFC/ mL para mesofilos, $8,64 \times 10^4$ UFC/ mL para levadura y $7,50 \times 10^3$ UFC/ mL para bacterias ácido lácticas; el licuado de vísceras presenta mayor contenido de estos microorganismos ya que presentaba mayor tiempo de exposición al medio ambiente, siendo condiciones óptimas para que estos microorganismos formen colonias y se multipliquen.

5.6 ANÁLISIS PROXIMAL DEL AISLADO PROTEICO

El análisis proximal del aislado proteico (tabla 17), muestra el alto contenido de proteína que fue de 84,74%, este valor se encuentra dentro del rango informado por autores como (Bhaskar et al., 2008, Kristinsson & Rasco, 2000a, Kristinsson & Rasco, 2000b), los cuales emplean sustratos para la realización de hidrólisis

enzimática de subproductos con porcentajes de proteína que se encuentran en un rango de 63,4% a 90,8%.

Tabla 17. Análisis proximal del aislado proteico

Determinación	Porcentaje
Cenizas*	8,82±0,01
Proteína*	84,74±0,02
Grasa*	2,84±0,02
Fibra*	1,17±0,03
Carbohidratos*	2,43±0,00

*Los resultados son expresados en base seca

La extracción de aceite hasta alcanzar valores bajos tales como el obtenido 2,84% es necesario debido a que los lípidos son grandes interferentes en el proceso de hidrólisis enzimática, algunos autores como García y colaboradores en el 2014, realizaron una investigación donde trabajaron con cinco especies descartadas en el mar Mediterráneo, sardina (*Sardina pilchardus*), jurel (*Trachurus mediterraneus*), Besugo (*Pagellus acarne*), la boga (*boops boops*) y la pintarroja pequeña manchada (*canícula Scylliorhinus*), encontrando que un incremento en la fracción lipídica del orden del 25,3%, reduce el grado de hidrólisis que oscilo entre 13,2 hasta 21,0, aún con altos contenidos de proteína que variaban de 60,7 hasta 75,5%. Además la disminución del contenido lipídico en la muestra, podría aumentar significativamente la estabilidad del producto frente a la oxidación de los mismos (Diniz & Martin, 1997; Kristinsson & Rasco, 2000b; Shahidi et al., 1995).

El contenido de cenizas fue de 8,82%, este valor ingresa en el rango obtenido por (Bhaskar et al., 2008; Chalamaiah et al., 2010; Choi et al., 2009; Mazorra-Manzano et al., 2011) que osciló entre 0,45% y 27% , el valor puede ser debido a la concentración del material mineral con el tratamiento de muestra hasta la obtención del aislado protéico.

Investigaciones realizadas por Wald y colaboradores. (2016), en la obtención del aislado proteico de vísceras de trucha arcoíris, indican que disminuyen el contenido de grasa de 55 a 0,74% y por lo tanto aumentan el contenido de proteína de 32 a 68%, para un grado de hidrólisis del 30%, comportamiento análogo al encontrado en este estudio donde se reduce el contenido lipídico de 69,16 a 2,84% y el contenido de proteína se incrementó de 27,27 a 84,74 %.

El aislado proteico poseía mayor contenido de grasa en comparación con el obtenido a partir de vísceras de *Oreochromis niloticus* (1,3-1,7%) y menor en relación con *M. mustelus* (3%) (Bougatf et al., 2009 y Yarnpakdee et al., 2014).

Mientras que el contenido de proteína fue mayor en comparación al alcanzado por el aislado proteico procedente de vísceras de *Oreochromis niloticus* (62,7%) (Robert et al., 2015), y *M. productus* (82,25%) (Benjakul & Morrissey, 1997).

5.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

El grado de hidrolisis determinado por el método TNBS en las 23 corridas del diseño experimental (Tabla 18), se encuentra en el rango de 31,8-66,8%, el valor más bajo de GH se obtuvo en el experimento 17, en condiciones de 40°C, relación enzima/ sustrato= 3, a 36 horas, mientras que el valor más alto de GH se obtuvo en el experimento 19.

Tabla 18. Diseño experimental.

Corrida de muestras	Tiempo h	[E/S] %p/p	Temperatura °C	GH %
1	12,0	3,0	40,0	56,3
2	3,8	5,5	50,0	61,3
3	44,2	5,5	50,0	40,3
4	24,0	5,5	33,2	39,1
5	36,0	8,0	60,0	53,6
6	24,0	5,5	50,0	59,0
7	24,0	5,5	50,0	58,2
8	24,0	5,5	50,0	60,4
9	24,0	5,5	50,0	58,2
10	24,0	5,5	50,0	60,3
11	24,0	5,5	50,0	58,0
12	24,0	1,3	50,0	43,5
13	12,0	8,0	60,0	57,4
14	36,0	3,0	60,0	56,9
15	36,0	8,0	40,0	54,9
16	24,0	5,5	66,8	50,9
17	36,0	3,0	40,0	31,8
18	24,0	5,5	50,0	63,4
19	12,0	8,0	40,0	66,5
20	24,0	9,7	50,0	54,6

21	24,0	5,5	50,0	57,6
22	24,0	5,5	50,0	57,9
23	12,0	3,0	60,0	57,6

5.7.1 ANÁLISIS ANOVA

El análisis ANOVA se muestra a continuación (Tabla 19), calculado con un nivel de 0,05 de significancia.

Tabla 19. Análisis ANOVA.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo	799,165	1	799,165	25,65	0,0002
B:[E/S]	327,761	1	327,761	10,52	0,0059
C:Temperatura	179,229	1	179,229	5,75	0,0310
AA	75,4504	1	75,4504	2,42	0,1420
AC	235,391	1	235,391	7,56	0,0157
BB	145,124	1	145,124	4,66	0,0488
BC	322,847	1	322,847	10,36	0,0062
CC	396,857	1	396,857	12,74	0,0031
Total (corridos)	2910,95	22			

Los factores y la combinación de factores que difieren (a nivel de 0,05) son los que presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí. Cuando el (valor-P) es mayor a 0,05 la interpretación es que el factor no influye en la variable dependiente que en este caso es el grado de hidrólisis, es decir, los distintos niveles del factor se comportan de igual forma en lo que a la variable dependiente se refiere. Pero si el (valor-P) es menor de 0,05, sólo se puede concluir que, por lo menos, dos niveles del factor producen distintos efectos en la variable dependiente (Portilla et al., 2006). De esta forma el análisis de varianza, indica que la reacción de hidrólisis enzimática es afectada de manera significativa por los tres factores: tiempo, relación enzima/sustrato y temperatura; además de las relaciones cuadráticas entre ellos.

El tiempo (valor-P=0,0002), es el factor con mayor influencia sobre el proceso, autores como Kechaou y colaboradores. (2009), encontraron un comportamiento análogo, analizando los cambios del grado de hidrólisis en el tiempo utilizando como sustrato vísceras de sepia (*Sepia officinalis*) y de sardina (*Sardina*

pilchardus), en condiciones de hidrólisis pH 8,5 , 50 °C, 24 horas y relación enzima sustrato de 1,5; para ambos casos, observaron que en las primeras cuatro horas, el grado de hidrólisis aumentaba de forma continua hasta llegar a un valor máximo de 3,2% para vísceras de sepia y 3,5 para vísceras de sardina, finalizado este tiempo no evidenciaron incremento en el GH.

La relación enzima/sustrato (valor-P=0,0059) tiene una influencia significativa en el proceso, estudios realizados por Batista y colaboradores. (2010), indicaron una tendencia similar, ellos evaluaron diferentes niveles de Protamex TM 0,5%, 1%, y 2%, en la hidrólisis proteica de vísceras de sable negro (*Aphanopus carbo*) bajo condiciones de reacción de pH: 7,5, tiempo: 2 horas, temperatura: 50 °C, y encontraron que el mayor grado de hidrólisis 57%, lo obtenían con la concentración de enzima más alta (2%).

Finalmente la temperatura (valor-P= 0,0310), es el factor que menor influencia genera sobre el proceso.

El modelo presento una R-cuadrada=85,0159 %, y un error absoluto medio de 3,42027, con lo que se garantiza que el modelo se ajusta y los puntos predichos tendrán buena correlación.

5.7.2 DIAGRAMA DE PARETO

La influencia en el grado de hidrólisis ante cambios en las variables, puede ser observada en el diagrama de Pareto estandarizado, en la (figura 22) se observa los factores ordenados de acuerdo a su influencia en el proceso tal como se indicó en el análisis de varianza ANOVA, en su respectivo orden de importancia, el que genera mayor influencia valor-P más pequeño, se ubica en la parte superior del gráfico y es el tiempo, el caso contrario donde el valor-p es más grande genera menor influencia y es la relación cuadrática del tiempo. En la gráfica se observan barras de dos colores, la tonalidad de las barras se utiliza para indicar que el factor influye de forma positiva (color gris) o de forma negativa (color azul) al proceso de hidrólisis enzimática y por tanto al grado de hidrólisis. La longitud de cada barra es proporcional al efecto estandarizado, el cual es el efecto estimado dividido entre su error estándar. En la gráfica se evidencia una línea vertical color azul que puede ser utilizada para juzgar cuales efectos son estadísticamente significativos, cualquier barra que se extienda más allá de la línea azul, corresponde a efectos que son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95% (Portilla, M., et al, 2006).

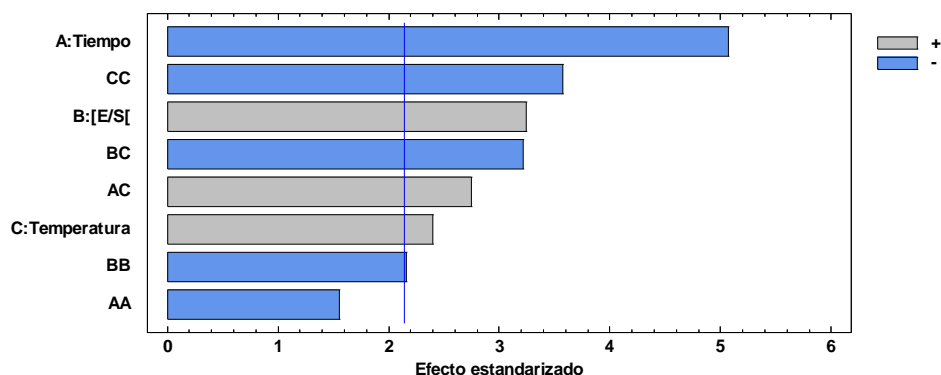


Figura 22. Diagrama de Pareto estandarizado.

El efecto que genera mayor influencia en el proceso es el tiempo y lo hace de forma negativa, es decir, un tiempo de exposición prolongado en la reacción enzimática no favorece el incremento del grado de hidrólisis, contrario a lo que se esperaría y esto podría deberse a la presencia de aminoácidos limitantes o a la inhibición de la enzima por los productos de hidrólisis (Valencia, Pinto & Almonacid, 2014).

La relación enzima/sustrato por su parte tiene una influencia positiva en el grado de hidrólisis, es decir, a mayor relación enzima/sustrato, existirá mayor número de sitios activos donde se podría generar el proceso hidrolítico para la generación de cadenas peptídicas, además un aumento en la concentración de enzima lleva a una rápida conversión de sustrato a producto.

Las tendencias obtenidas en cuanto al tiempo y a la relación enzima sustrato son similares a las encontradas por Guerard y colaboradores. (2001), Quienes realizaron un proceso de hidrólisis proteica en vísceras de atún de aleta amarilla (*Thunnus albacares*), evaluando el efecto de la concentración de enzima y el tiempo, respecto al grado de hidrólisis, encontrando un valor máximo de GH= 23% con la concentración de enzima más alta 23 UA/g, también se evidenció que la prolongación de la reacción de hidrólisis por más de 5,5 horas no produjo un aumento significativo en el GH.

Por último se tiene como factor influyente la temperatura, dicho efecto es positivo indicando que al incrementarse la temperatura, el grado de hidrólisis lo hará también, llegando a un máximo donde la enzima presenta su actividad optima esto es debido a que las enzimas son proteínas, y su estructura cuaternaria se ve afectada con cambios en la temperatura por ende la actividad de las mismas. Shahidi et al. (1995) reportan que el mayor grado de hidrólisis de 22% lo consiguieron a la temperatura más alta propuesta que fue de 65°C, en la reacción de hidrólisis enzimática de proteínas de capelán usando Alcalasa.

5.7.3 DIAGRAMA DE EFECTOS PRINCIPALES

El diagrama de efectos principales (figura 23) ilustra el comportamiento de los tres factores de forma independiente y su incidencia en el grado de hidrólisis, en cada gráfica, el factor varía del nivel bajo al nivel alto. El primer factor que se evidencia es el tiempo y por medio de la gráfica decreciente trazada entre 12 a 36 horas, se observa como a medida que avanza el tiempo el grado de hidrólisis disminuye, a un tiempo corto se logra el valor más alto de GH, al incrementar la relación enzima/sustrato de 3 a 8% se incrementa el grado de hidrólisis hasta llegar a un máximo, de igual forma, al aumentar la temperatura de 40 a 60 °C el grado de hidrólisis incrementa su valor, hasta un máximo, posteriormente la línea comienza a descender, esto se debe a la influencia que tiene la temperatura en la actividad de la enzima lográndose una mayor actividad cuando se tiene la temperatura óptima de la misma.

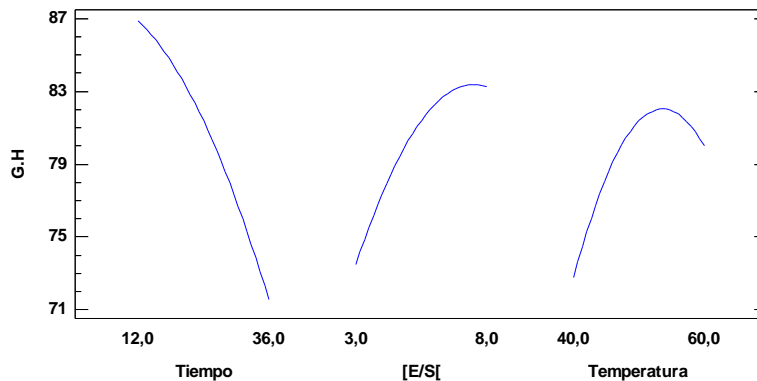


Figura 23. Diagrama de efectos principales

Se observa un comportamiento gaussiano en la gráfica de relación enzima/sustrato y en la de temperatura, encontrándose los valores máximos para los dos factores lo que indicaría que se determinaron los valores óptimos para lograr un mayor grado de hidrólisis.

5.7.4 GRÁFICA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

La gráfica de superficie de respuesta (figura 24) ilustra los diferentes contornos discriminados en colores, cada uno representa un valor de grado de hidrólisis, esta gráfica es realizada por el modelo matemático que mejor se ajustó a los datos

obtenidos y es importante debido a que permite establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta que en este caso es el grado de hidrólisis, en la gráfica se observa que a un corto tiempo y a una relación enzima sustrato alta se genera el mayor grado de hidrólisis localizado dentro del contorno rojo, como también se ilustra que a un tiempo largo mayor a 10 horas y a una relación enzima sustrato menor a 4% se obtiene los valores más bajos de grado de hidrólisis.

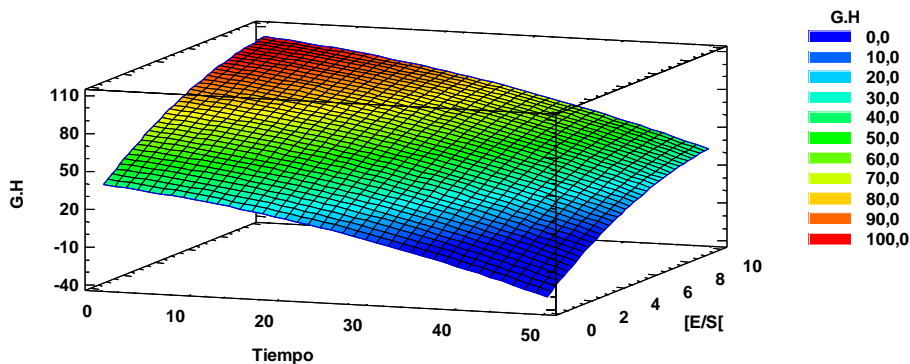


Figura 24. Grafica de superficie de respuesta

5.7.5 VALORES ÓPTIMOS

El valor óptimo de grado de hidrólisis fue 67%, obtenido bajo las condiciones expuestas en la tabla 20, la corroboración del valor óptimo se realizó en una unidad experimental encontrando un valor cercano de 63,2%.

Tabla 20. Valores óptimos para el grado de hidrólisis.

Factor	Óptimo
Tiempo (h)	3,81
[E/S]	9,70
Temperatura (°C)	33,87

El GH de 67% obtenido en este estudio fue superior al reportado por Bhaskar et al. (2007), en la hidrólisis enzimática de vísceras de Catla (*Catla catla*) quienes consiguieron un GH del 48% a una temperatura de 55°C, tiempo de 2,75 h y una relación enzima-sustrato de 1,25, empleando la enzima multifect-neutral, el coeficiente de correlación que alcanzaron fue de $r=0,968$, este valor cercano a 1,

indica la validez del modelo de predicción con un porcentaje de proteína de 70,54%. De igual forma, Je y colaboradores. (2015), realizaron la hidrólisis enzimática de proteínas provenientes de vísceras de pescado abulón, empleando la enzima protamex y evaluaron el efecto de la temperatura, pH, sobre el GH, donde reportaron valores de GH de 55,61%, a una temperatura de 50°C, pH 7, tiempo de 8 horas y relación enzima sustrato de 1,5. El valor de GH comparado con el obtenido en este trabajo es inferior y esto podría deberse al bajo contenido de proteína que consigue con el aislado proteico que es de 65,03%, en comparación con el porcentaje de proteína obtenido con este trabajo que fue de 84,74%, por lo tanto, la purificación de la fracción proteica, genera mayor concentración de enlaces hidrolizables, por lo tanto mayor grado de hidrólisis.

Ovissipour et al. (2009), efectuaron un proceso de hidrólisis enzimática de vísceras del esturión persa (*Acipenser persicus*), a tres temperaturas diferentes 35, 45 y 55 °C, pH 8,0, empleando como enzima alcalaza, por un periodo de tiempo de 3,41 horas y obtuvieron un GH de 46,13%, este valor de GH es menor al encontrado en el presente estudio posiblemente porque en la elaboración del aislado proteico obtuvieron un porcentaje de proteína de 65,82%, al igual que la referencia anterior un incremento en la concentración de proteína en el sustrato, aumenta la concentración de enlaces hidrolizables, por lo tanto se favorece el valor de GH.

Por otra parte, Souissi et al. (2007) reportaron que los hidrolizados con valores altos de GH contienen altos niveles de aminoácidos hidrófilos. De acuerdo con los resultados del presente estudio, se puede predecir que los hidrolizados obtenidos a partir de vísceras de trucha arcoíris tienen muchos más aminoácidos hidrofílicos que aminoácidos hidrófobos, lo cual favorece la solubilidad del hidrolizado y amplía la aplicación del mismo.

Aunque los valores encontrados en este estudio fueron mejores que los reportados por diferentes autores, no es posible llegar a un grado de hidrólisis del 100%, lo que indicaría un rompimiento total de los enlaces peptídicos de la proteína original, esto es debido a que la enzima tiene centros de acción catalítica específicos, rompiendo así, ciertos enlaces peptídicos y generando al medio de reacción péptidos y aminoácidos con algunas características.

5.8 SEGUIMIENTO DE LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS EN EL TIEMPO

El seguimiento de la reacción de hidrólisis enzimática evidencia dos etapas: la primera, que se caracteriza por una alta velocidad de reacción, durante la cual se escinde un gran número de enlaces peptídicos por unidad de tiempo, debido a la disponibilidad para el rompimiento por parte de la enzima a polipéptidos de alto peso molecular, en la (figura 25) se observa este incremento hasta los 100 minutos (1 hora y 40 minutos); y la segunda, cuando hay una reducción en la velocidad, que tiende a alcanzar un comportamiento estacionario, análogo al obtenido finalizado el tiempo de reacción de hidrólisis enzimática (4 horas). Según algunos autores (González-Tello et al, 1994; Guerard et al, 2002), esta reducción se explica por tres factores principales: (i) menor concentración de enlaces peptídicos disponibles para la escisión por la proteasa, (ii) la posible inhibición de la enzima, causada por algunos productos resultantes de la hidrólisis y (iii) la desnaturalización de la enzima.

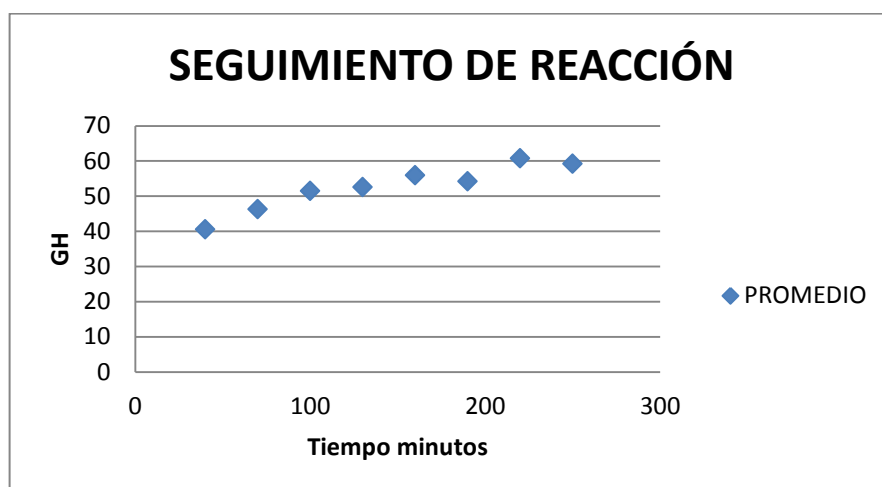


Figura 25. Seguimiento de la reacción de hidrólisis en el tiempo.

Un comportamiento similar obtuvieron Silva et al., (2014), Bougatef et al., (2010), Tang et al., (2009) y Chabanon et al.,(2007), en la hidrólisis enzimática de subproductos de: camarones, sardina, proteínas de trigo sarraceno y la proteína de colza, respectivamente.

5.9 COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS

En la tabla 21, se encuentra el perfil de aminoácidos correspondiente a las vísceras de trucha arcoíris, las concentraciones de aminoácidos en orden decreciente corresponden a: arginina (7,89 %), fenilalanina (6,77%), leucina (5,22%), alanina (5,10%), prolina (4,75%), aspártico (4,25%), valina (4,24%), treonina (3,47%); Estos valores son menores a los obtenidos por (Je, Park, Hwang & Ahn. 2015) en una matriz compuesta por vísceras de abalone, quien reporta concentraciones de aminoácidos de: ácido glutámico (15%), ácido aspártico (12,3%) y glicina (10,6 %), arginina (7,2%), alanina (6,7%), leucina (5,8%), y treonina (5,7%). El porcentaje total de los aminoácidos esenciales fue de 36,98%.

Tabla 21. Composición de aminoácidos en vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Nombre	Contenido %(P/P)
Aspártico	4,25
Serina	2,01
Histidina	1,33
Glutamico	2,52
Arginina	7,89
Treonina	3,47
Alanina	5,10
Prolina	4,75
Tirosina	0,70
Valina	4,24
Metionina	3,29
Lisina	1,58
Isoleucina	3,19
Leucina	5,22
Fenilalanina	6,77
Triptófano	No determinado

Los aminoácidos esenciales aportados por el filete de pescado, fueron estudiados por autores como Izquierdo y colaboradores en el año 2000, determinaron el perfil de aminoácidos a: bocachico, cachama, carpeta, corvina, lisa, merluza, mero, pargo, robalo, tilapia y trucha; encontrando que el rango para los aminoácidos era de: histidina 0,721-1,625g/100g; treonina 0,442- 2,225 g/100g; valina 0,439-1,413; metionina 0,271-0,648 g/100g; lisina 0,770-1,916 g/100g; isoleucina 0,421-1,583 g/100g; leucina 1,017-1,948 g/100g; fenilalanina 0,550-1,117g/100g, los aminoácidos esenciales presentes en las vísceras con su respectivo porcentaje

(g/100g de vísceras) fueron: histidina 1,33; treonina 3,47; valina 4,24; metionina 3,29; lisina 1,58; isoleucina 3,19; leucina 5,22; fenilalanina 6,77. Los valores obtenidos en el presente estudio son mayores a los del filete en las diferentes especies, indicando que se está perdiendo alto valor nutritivo en las vísceras siendo necesario recuperarlas.

Tabla 22. Composición de aminoácidos en aislado protéico.

Nombre	Tiempo de retención	Área	Contenido %(P/P)
AMQ	6,042	4906351	0,000
Aspártico	9,667	12208	6,114
Serina	10,183	119236	5,860
Asparagina	10,275	41355	4,245
Glutamico	10,658	104623	3,772
Glicina	11,650	164999	9,993
Histidina	11,967	208706	5,091
Arginina	12,783	69804	1,430
Treonina	14,983	71031	8,018
Alanina	15,575	129894	4,021
Prolina	16,667	249612	5,512
Tirosina	18,633	36307	4,965
Cisteína	18,800	9632	0,503
Valina	19,275	118345	4,042
Metionina	19,592	50864	2,128
Lisina	20,475	200865	6,572
Isoleucina	21,083	140099	4,172
Leucina	21,333	142635	5,347
Fenilalanina	21,858	59454	2,581
Triptófano	-	-	No detectado

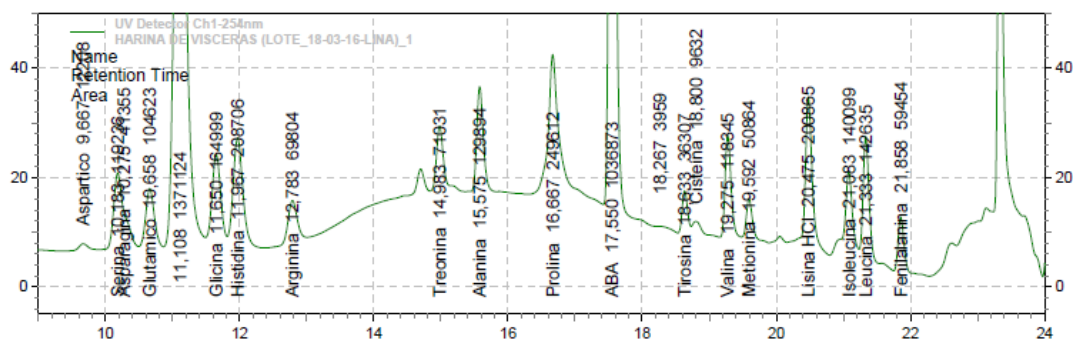


Figura 26. Aminograma aislado protéico.

El aminograma correspondiente al aislado proteico se encuentra en la (figura 26), y la composición de aminoácidos en la tabla 22, donde se evidencia que el tratamiento efectuado que incluía procesos de molienda, desengrasado, deshumificación, no disminuyeron el contenido de aminoácidos, por el contrario, al eliminar interferentes y aislar la proteína los aminoácidos se encontraban más disponibles en la matriz, lo cual concuerda con lo reportado por Opheim et al. (2015).

El aislado proteico se componía de 84,367 g / 100 g de aminoácidos, de los cuales 39,381 g / 100 g eran aminoácidos esenciales. El porcentaje obtenido corresponde con el 84% de proteína reportado en este trabajo para el análisis proximal, indicando que todo el nitrógeno hacia parte de los aminoácidos. Las concentraciones de los aminoácidos en forma decreciente son: glicina (9,993%), treonina (8,018%), lisina (6,572%), aspártico (6,114%), serina (5,86%), prolina (5,512%) y leucina (5,347%); estos valores son mayores a los reportados por (Robert, M. et al., 2015), quienes encontraron en el aislado protéico de vísceras de Tilapia (*Oreochromis niloticus*) 68,2 g / 100 g de aminoácidos, de los cuales 32,5 g / 100 g de peso fueron aminoácidos esenciales, entre los que obtuvieron mayores concentraciones se encuentran glicina (7,00%), ácido aspártico (6,06%), lisina (5,09%) y alanina (5,06%).

Tabla 23. Composición de aminoácidos en el hidrolizado a condiciones óptimas.

Nombre	Tiempo de retención	Área	Contenido %(P/P)
AMQ	6,058	102679	0,000
Aspártico	9,658	319720	18,981
Serina	10,267	168791	0,983
Asparagina	10,308	203018	2,470
Glutamico	11,650	6308	0,027
Glicina	11,967	131309	0,943
Histidina	9,658	578974	1,674
Arginina	0	0	No detectado
Treonina	14,975	186292	2,493
Alanina	15,575	496667	1,823
Prolina	16,658	540383	1,414
Tirosina	18,633	875199	14,188
Cisteína	18,975	4115	0,025
Valina	19,275	717329	2,905
Metionina	19,592	410227	2,034
Lisina	20,483	170878	0,663

Isoleucina	21,083	694422	2,452
Leucina	21,333	1225973	5,448
Fenilalanina	21,867	1106859	5,695
Triptófano	22,183	329295	2,284

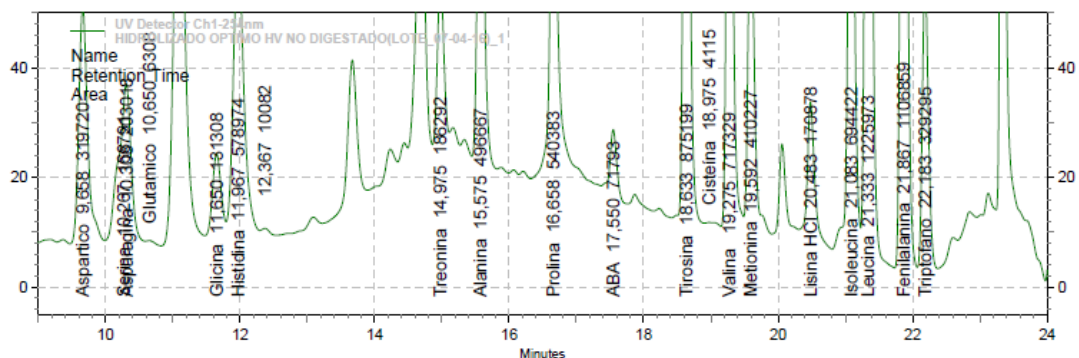


Figura 27. Aminograma del hidrolizado obtenido a condiciones óptimas.

En la tabla 23, se reporta el contenido de aminoácidos presentes en el hidrolizado realizado a condiciones óptimas, donde se obtuvo 70,503 g / 100 g de aminoácidos, de los cuales 25,548 g / 100 g eran aminoácidos esenciales. Las concentraciones de los aminoácidos en forma decreciente son: ácido aspártico (18,981%), tirosina (14,188%), fenilalanina (5,695%), leucina (5,448%), valina (2,905%), treonina (2,493%) y asparagina (2,470%); los valores obtenidos son mayores a los encontrados por Wald et al. (2016) en el hidrolizado de proteínas de trucha, quienes encontraron concentraciones de leucina (4,63%), lisina (5,11%), alanina (4,35%), arginina (4,80%), ácido aspártico (5,84%), ácido glutámico (8,71%) y glicina (5,34%).

La concentración de ácido aspártico es la más alta (18,981%), respecto a los demás aminoácidos, este dato concuerda con el obtenido por Chalamaiah y colaboradores en el año 2012, donde hidrolizados de especies como el capelán (*Mallotus villosus*), la merluza del Pacífico (*Merluccius productus*) o salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*) contenían ácido aspártico en una alta proporción; Morales-Medina et al. (2016), encontraron concentraciones de ácido aspártico de (27,6% y 29,4%) correspondientes a hidrolizados de proteína muscular de sardina (*Sardina pilchardus*) y de jurel (*Trachurus mediterraneus*) respectivamente, valores que junto con el ácido glutámico representaban casi el 45% en peso del contenido total de aminoácidos.

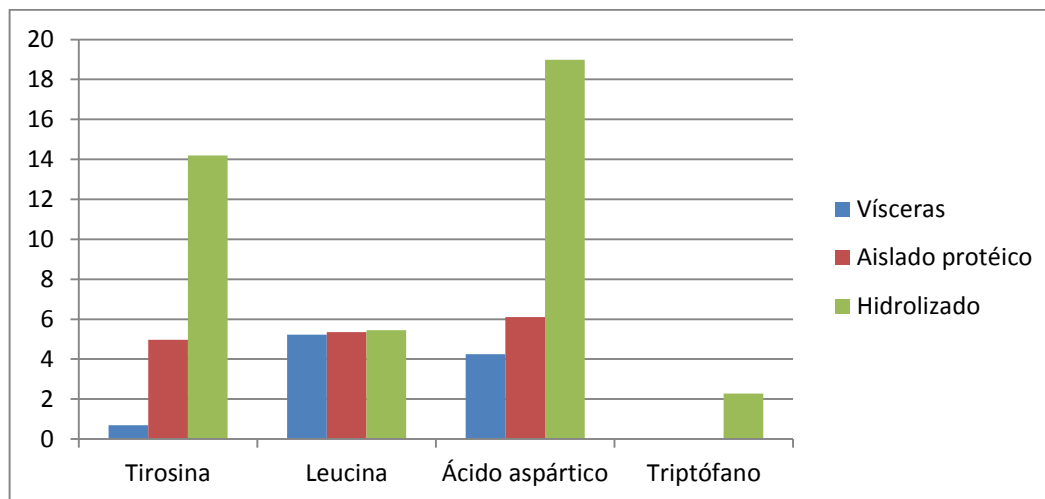


Figura 28. Aminoácidos con tendencia a aumentar la concentración.

El contenido de leucina, triptófano, tirosina y ácido aspártico, fue mayor en los hidrolizados, en comparación con las vísceras y el aislado protéico, tal como se observa en la (figura 28), el incremento en la concentración hasta la obtención del aislado protéico se podría explicar por los tratamientos preliminares que tuvo el aislado lo cual generó mayor porcentaje de proteína y el incremento desde el aislado protéico hasta la consecución del hidrolizado puede ser debido al proceso de hidrólisis enzimática, que genera el rompimiento de la proteína liberando péptidos y aminoácidos, por otro lado, el triptófano solo pudo ser detectado en el hidrolizado; los resultados anteriores son análogos a los encontrados por Opheim et al. (2015) con hidrolizados de vísceras de salmón atlántico (*Salmo salar*). Estos aminoácidos desempeñan un papel importante en diversas actividades fisiológicas del cuerpo humano y afectan directa o indirectamente el mantenimiento de una buena salud, el triptófano por ejemplo es un aminoácido esencial que se encarga de la producción de serotonina y estimula la producción de vitamina B3, por lo tanto es de vital importancia que sea liberado en el proceso de hidrólisis, para el posterior uso del mismo.

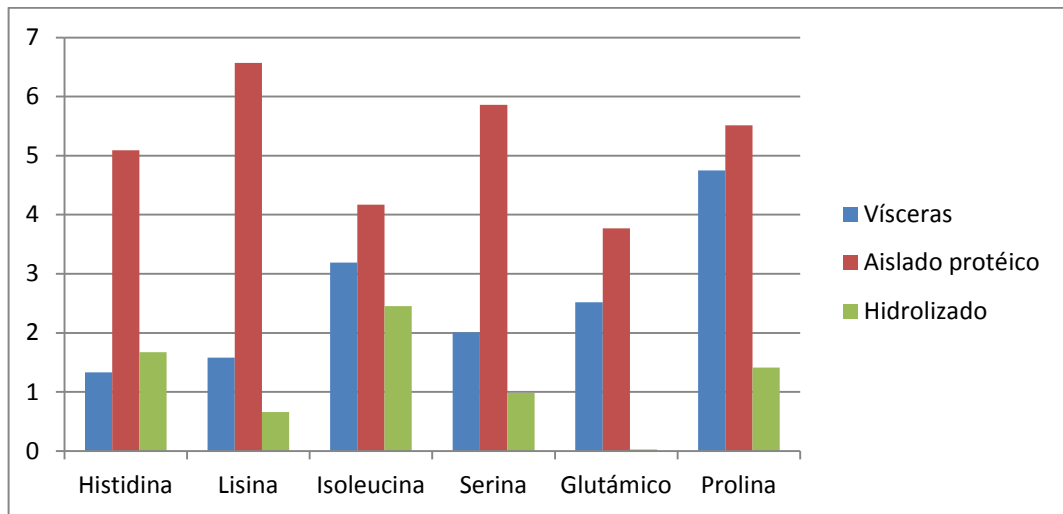


Figura 29. Comparación de aminoácidos.

La tendencia observada en la (figura 29) es similar a la de la (figura 28) en cuanto al incremento en la concentración hasta la obtención del aislado protéico, la diferencia se encuentra en la disminución que se genera al conseguir el hidrolizado, aminoácidos como histidina, lisina y serina son los que tienen un comportamiento más marcado, la disminución en la concentración en los anteriores aminoácidos puede ser debida al tratamiento de inactivación para terminar la reacción de hidrólisis que se efectuó por 15 minutos a 80 °C ya que los aminoácidos por acción de la hidrólisis enzimática ya se encontraban liberados y eran más susceptibles a daños por acción de la temperatura.

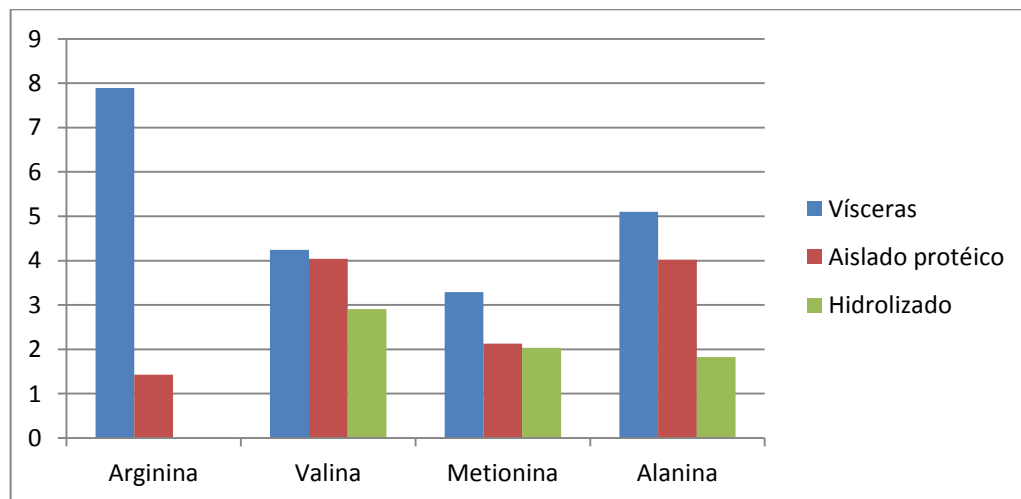


Figura 30. Comparación de aminoácidos que disminuyen su concentración.

En la figura 30 se observa la disminución en la concentración de los aminoácidos, arginina, valina, metionina y alanina en el transcurso de los tratamientos, estos datos atípicos podrían ser debidos al uso de base utilizado para mantener el pH en el valor óptimo para el proceso de hidrólisis, el cual, incluso a temperaturas suaves, puede degradar aminoácidos (Álvarez et al., 2013). Fountoulakis y Lahm. (1998), reportan que bajo ciertas condiciones, algunos aminoácidos como por ejemplo, serina, treonina, metionina, cisteína y triptófano, se pueden degradar parcial o completamente dependiendo de la concentración de base utilizada, el tiempo de exposición y la temperatura, es por esto que se reportan bajas concentraciones en el hidrolizado de: arginina (no se detectó), serina (0,983%), treonina (2,493%), metionina (2,034%).

Estos hidrolizados podrían presentar alto valor nutricional dado que son ricos en aminoácidos esenciales, y al mismo tiempo tiene un bajo contenido de lípidos y cenizas.

En la formulación de dietas para la alimentación animal diferentes autores (Berres et al., 2010; Goulart, 2010; Corzo et al., 2009) han mencionado que metionina, triptófano, tirosina y valina, hacen parte de los aminoácidos limitantes es decir que están presentes en el alimento en una concentración inferior a la exigida para su desarrollo, por lo tanto que deben ser suplementadas con la adición de más ingredientes al alimento que incrementa su precio en un 40 %. El hidrolizado y el aislado protéico obtenido podrían ser utilizados como fuente de estos aminoácidos tienen concentraciones altas respecto a las vísceras de partida, además de ser una materia prima económica que engloba los aminoácidos requeridos en las formulaciones.

Los requerimientos de los aminoácidos más importantes en 5 especies de peces (carpa común, trucha arco-iris, bagre de canal, anguila japonesa, y el salmón "chinook"), se encuentran en el rango de: histidina (1,4-1,9%), isoleucina (2,2-2,5%), leucina (3,3-4,1%), lisina (3,7-5,3%), metionina (1,3-2,0%), fenilalanina (2,0-2,9%), treonina (2,2-3,6%), triptófano (0,5-0,7%) y valina (2,9-3,6%) (FAO, 1989). El hidrolizado y el aislado protéico tenían una composición equilibrada, con todos los aminoácidos esenciales presentes en cantidades mayores a las requeridas por las especies de peces antes mencionadas, lo que confirma su potencial para su uso en alimentos acuícolas.

6 CONCLUSIONES

De acuerdo a los valores obtenidos en el análisis proximal, se concluye que las vísceras de trucha arcoíris son una fuente importante de proteínas y lípidos, con valores de 27,27% y 69,16% respectivamente, siendo representativos en comparación a valores reportados en la parte comestible del pescado, indicando que se está desperdiciando una materia prima que podría tener gran funcionalidad.

La presente tesis demostró la posibilidad de obtener un aislado proteico y consecuentemente un producto hidrolizado a partir de subproductos de trucha arcoíris, mediante la implementación de hidrólisis enzimática.

El aislado protéico obtenido en este estudio presentó un alto porcentaje de proteína 84,74 % en comparación con otros autores, indicando que todo el tratamiento de la muestra fue apropiado para eliminar interferentes de la matriz, los procesos a los que fue sometida no generaron mayor daño en los aminoácidos.

El perfil de aminoácidos en las vísceras, aislado protéico e hidrolizado mostró como esta materia prima es rica en aminoácidos esenciales y no esenciales, los cuales podrían ser destinados a diferentes aplicaciones.

El modelo matemático obtenido para la reacción de hidrólisis enzimática permitirá determinar diferentes valores de grado de hidrólisis, de acuerdo al uso que se quiera tener, como mejorar propiedades tecnofuncionales o realizar una inclusión de estos productos para la formulación de dietas especializadas.

7 BIBLIOGRAFÍA

A.O.A.C., Official Methods of Analysis of the Association of Chemists, 1990, 15ª Ed.

Alonso, A., Antelo, L., Otero, I., y Pérez, R. (2010). Contributing to fisheries sustainability by making the best possible use of their resources: the BEFAIR initiative. *Trends Food Sci. Technol*, 21, 569–578.

Alvarez, C., Rendueles, M., y Díaz, M. (2013). Alkaline hydrolysis of porcine blood haemoglobin: applications for peptide and amino acid production. *Animal Production Science*, 53(2), 121-128.

Annadurai, D., Sadeeshkumar, R., Vijayalaksmi, M., y Pirithiviraj, N. (2012). Studies on growth of marine bacteria using marine fish waste medium. *Journal of Pharmaceutical & Biological*, 3(4), 910-913.

Aspmo, S., Cuerno, S., y Eijsink, V. (2005). Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*, 40(5), 1957-1966.

Ávila, M., Insuasty, I., y Guevara, E. (2008). Organogénesis del sistema digestivo del pez *Pterophylum scalare* (Perciformes: Cichlidae). *Revista de Biología Tropical*, 56(4), 703-712.

Badui, S. Química de alimentos. Cuarta edición. Pearson educación. Mexico. 2006. pp 310-317.

Bae, I., Osatomi, K., Yoshida, A., Osako, K., Yamaguchi, A., y Hara, K. (2008). Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilized fishes. *Food Chem*, 108, 49–54.

Balti, R., Bougatef, A., El Hadj Ali, N., Ktari, N., Jellouli, K., Nedjar, N., Dhulster, P y Nasri, M. (2011). Comparative study on biochemical properties and antioxidative activity of cuttlefish (*Sepia officinalis*) protein hydrolysates produced by Alcalase and *Bacillus licheniformis* NH1 proteases. *Journal of Amino Acids*, 2011, 1–11.

Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarrra, N., y Nunes. M. (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.

- Baziwane, D., y He, Q. (2003). Gelatin: the paramount food additive. *Food Rev. Int*, 19 (4), 423–435.
- Benitez, R., Ibarz, A., y Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: Procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 228-236.
- Benjakul, S., y Morrissey, M. T. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), 3423–3430.
- Berres, J., Vieira, S., y Dozier, I. (2010). Broiler responses to reduced-protein diets supplemented with valine, isoleucine, glycine, and glutamic acid. *Journal of Applied Poultry Research*, 19, 68-79.
- 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 hydrolysates using a commercial protease. *Bioresource Technology*, 99, 335– 343.
- Bhaskar, N., y Mahendrakar, N. S. (2008). Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*): Optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease. *Bioresource Technology*, 99, 4105–4111.
- Blanco, M., Sotelo, C.G., Chapela, M.J., y Pérez-Martín, R. (2007). Towards sustainable and efficient use of fishery resources: present and future trends. *Trends Food Sci. Technol*, 18, 29–36.
- Bohórquez, L. (2015). La importancia del plan de manejo ambiental para la formulación de estrategias de aprovechamiento industrial y económico de los residuos de la cadena piscícola (Tesis de pregrado). Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá.
- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114(4), 1198–1205.
- Cano, G., Ayala, F y López, A. (2016). ESTÓMAGO, HÍGADO, INTESTINO, BAZO Y PÁNCREAS DE LOS PECES F. Anatomía Veterinaria, Universidad de Murcia. <http://www.um.es/anatvet/Documentos/Curso-Peces/pdfs/Estomago%20higado%20intestino%20bazo%20pancreas%20de%20los%20peces.pdf>

Chalamaiah, M., Dinesh kumar, B., Hemalatha, R., y Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chemistry*, 135(4), 3020-3038.

Chalamaiah, M., Narsing Rao, G., Rao, D. G., y Jyothirmayi, T. (2010). Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. *Food Chemistry*, 120, 652–657.

Choi, Y. J., Hur, S., Choi, B. D., Konno, K., y Park, J. W. (2009). Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. *Journal of Food Science*, 74, C17–C24.

Corzo, A., y Loar, I. (2009). Limitations of dietary isoleucine and valine in broiler chick diets. *Poultry Science*, 88,1934-1938.

Crude Fiber Analysis. En: Official Methods of Analysis. AOAC 962.09. 18th ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.

Dautremepuits, D.J. Marcogliese, A.D. Gendron, M. Fournier. (2009). Gill and kidney antioxidant processes and innate immune system responses of yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to different contaminants in the St. Lawrence River, Canada. *Science of the Total Environment*, 1, 1055–1064.

Determination of moisture content. En: Official Methods of Analysis. AOAC 950.43. 18th ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.

Determination of the nitrogen content. En: Official Methods of Analysis. AOAC 968.06. 18th ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.

Evans, R.P., y Fletcher, G.L. (2004). Isolation and purification of antifreeze proteins from skin tissues of snailfish, cunner and sea raven. *Biochim. Biophys*, 1700, 209–217.

FAO, 1991. Fish for Food and Development. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Italia.

FAO, 2005. Programa de información de especies acuáticas (*Oncorhynchus mykiss*). *Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO*. 15 de junio de 2015. Roma, Italia.

FAO, 1989. Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados: Manual de capacitación. Brasil.

Fat in Feeds. En: Official Methods of Analysis. AOAC 991.36. 18th ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.

Fennema, O. Food Chemistry. Second edition. Marcel Dekker. New York. 1993. pp 448-454

Fernandes, A., Fontainhas, M., Ferreira, M., Salgado, M. (2008). Respuesta al estrés oxidativo en las branquias y el hígado de *salien*s *Liza*, de la Laguna Costera Esmoriz Páramos, Portugal. Archivos de Contaminación y Toxicología Ambiental, pp. 262-269.

Fountoulakis, M., y Lahm, H.-W. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*, 826(2), 109-134.

García, J., Núñez, F., Chacón, O., Alfaro, R., y Espinosa, M. (2004). Calidad de canal y carne de trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* Richardson, producida en el noroeste del Estado de Chihuahua. *Hidrobiológica*, 14(1), 19-26.

García, P., Batista, I., Pires, C., Bandarra, N., Espejo, F., Guadix, A., y Guadix, E. (2014). Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. *Food Research International*, 65(C), 469-476.

Ghorbel, S., Souissi, N., Triki-Ellouz, Y., Dufosse, L., Guerard, F., y Nasri, M. (2005). Preparation and testing of Sardinella protein hydrolysates as nitrogen source for extracellular lipase production by *Rhizopus oryzae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(1), 33-38.

Goosen, N., De Wet, L., y Görgens, J. (2014a). Fish silage oil from rainbow trout processing waste as alternative to conventional fish oil in formulated diets for Mozambique tilapia (*Oreochromis mosambicus*). *Animal feed science and technology*, 74-84.

Goulart, C.C. (2010). Relación de Aminoácidos esenciales y no esenciales en las dietas para pollos de engorde. Universidad Federal de Paraíba, Tesis (Doctorado en Ciencia Animal).141.

Guadix, A., Guadix, E., Páez, M., González-Tello, P., y Camacho, F. (2000). Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79-89.

Guillaume, J., S. Kaushik, P. Bergot y R. Mátallier, (2001). Nutrition and feeding of fish and crustaceans. Watson, J. Praxis publishing Ltd, Chichester, UK; pp 407.

Haard, N. F., 1990. Enzymes from myosystems. *Journal of Muscle Foods*. pp 293-330

Huss, H. (1999).El pescado fresco: su calidad y cambios en su calidad. FAO, Documento Técnico de Pesca N° 348. Dinamarca.

Izquierdo, P., Torres, G., Barboza, Y., Márquez, E y Allara, María. (2000). Análisis proximal, perfil de ácidos grasos, aminoácidos esenciales y contenido de minerales en doce especies de pescado de importancia comercial en Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(2), 187-194.

Kechaou, E., Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Jaouen, P., Gouygou, J., Bergé, J., & Amar, R. (2009). Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. *Process Biochemistry*, 107(2), 158-164.

Khantaphant, S., Benjakul, S., y Kishimura, H. (2011). Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial proteases. *Process Biochemistry*, 46, 318–327.

Kim, S., y Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of functional foods*, 2, 1-9.

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., y Shahidi, F. (2012). Cryoprotective effect of gelatin hydrolysate from blacktip shark skin on surimi subjected to different freeze thaw cycles. *LWT – Food Science and Technology*, 47, 437–442

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, 1317–1327.

Klomklao, S., Benjakul, S., y Kishimura, H.(2010). Proteinases in hybrid catfish viscera: Characterization and effect of extraction media. *Journal of Food Biochemistry*, 34, 711–729.

Kristinsson, H. G., y Rasco, B. A. (2000a). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 657–666.

Kristinsson, H. G., y Rasco, B. A. (2000b). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 43–81.

Krogdahl, A., Sundby, A., y Holm, H. (2015). Characteristics of digestive processes in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Enzyme pH optima, chyme pH, and enzyme activities. *Aquaculture*, 449, 27-36.

Levine, S.T, Oris, J.T. CYP1A expression in liver and gill of rainbow trout following waterborne exposure: implications for biomarker determination. *Aquatic Toxicology*, 1999, pp. 279–287

Lignot, B., Lahogue, V., y Bourseau, P. (2003). Enzymatic extraction of chondroitin sulfate from skate cartilage and concentration/desalting by ultrafiltration. *J. Biotechnol*, 103 (3), 281–284.

Lopes, C., Antelo, L., Franco, A., Alonso, A., y Pérez, R. (2015). Valorisation of fish by-products against waste management treatments – Comparison of environmental impacts. *Waste Management*, 46, 103–112.

Nazrul, I. y A. Razzaq. (2005). Seasonal variation of the proximate composition of freshwater gobi, *Glossogobius giuris* (Hamilton) from the River Padma. *Pak. J. Biol. Sci*, 8, 532-536.

Nicanor, A., Ortiz, A., Martínez, A., y Davila, G. (2001). Guava seed protein isolate: functional and nutritional characterization, *Food Biochem*, 25, 77- 90.

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.

Nissen, A. (2002). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 27, 1256-1262.

Mancini, M. (2002). Introducción a la biología de los peces, Producción Animal I, FAV UNRC. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_peces/piscicultura/07-introduccion_biologia_peces.pdf

Martínez, J. (1996). La perfusión de branquias como modelo de valoración de la calidad de agua y su relación con la producción intensiva de truchas (Tesis doctoral). Universidad Complutense De Madrid, España.

Martinez, R.(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). Universidad Nacional de Colombia.

Mazorra-Manzano, M. A., Pacheco-Aguilar, R., Ramirez-Suarez, J. C., Garcia-Sanchez, G., y Lugo-Sanchez, M. E. (2011). Endogenous proteases in Pacific Whiting (*Merluccius productus*) muscle as a processing aid in functional fish protein hydrolysate production. *Food and Bioprocess Technology*.

Mineral analysis by ICP-OES. En: Official Methods of Analysis. AOAC 14004. 18th ed. Gaithersburg, MD: The association, 2005.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente en España. (2012). GUÍA PARA EL APROVECHAMIENTO DE LOS SUBPRODUCTOS DE PESCADO PARA LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS FUNCIONALES Y BIOACTIVOS. Madrid, España. Recuperado de http://www.magrama.gob.es/es/pesca/temas/calidad-seguridad-alimentaria/06-Guia_Subproductos_tcm7-248616_tcm7-320453.pdf

Miller, J. C. y Miller, J. N. (2002). “Estadística y Quimiometría para Química Analítica”. 4ª Edición. Ed. Prentice Hall. Madrid. pp 125-215.

Moyle, P. y Cech, J. (2000). *Fishes: An Introduction to Ichthyology*. Fourth Edition. Prentice Hall, Inc. USA. 612.

Montaña, A. (2009). Crecimiento y sobrevivencia en el levante de alevinos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en sistemas cerrados de recirculación de agua. Universidad nueva militar nueva granada. p 76.

Morales-Medina, R., Tamm, F., Guadix, A. M., Guadix, E. M., & Drusch, S. (2016). Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. *Food Chemistry*, 194, 1208-1216.

Murray, R., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., y Weil, A. (edición 23). (2013). Harper. *Bioquímica Ilustrada*. México. Editorial: MCGRAW-HILL. pp 200-260.

Oliveira, V.L. Maria, I. Ahmad, A. Serafim, M.J. Bebianno, M. Pacheco, M.A. Santos. Contamination assessment of a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal) using defence and damage biochemical indicators in gill of *Liza aurata* – an integrated biomarker approach. *Environmental Pollution*, 2009, pp. 959–967.

Oliveira, D., Minozzo, M., Licodiedoff, S., y Waszczynski, N. (2016). Physicochemical and sensory characterization of refined and deodorized tuna (*Thunnus albacares*) by-product oil obtained by enzymatic hydrolysis, *Food chemistry*, 207, 187-194.

Omura, Y., y Inagaki, M. (2000). Immunocytochemical localization of taurine in the fish retina under light and dark adaptation. *Amino Acids*, 19, 593–604.

Orvay, F. Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Primera edición. Barcelona. 1993, pp: 264-265.

Ortega C, de Blas I. Selección de Muestras para el Estudio de Poblaciones Animales en Acuicultura . *Revista AquaTIC*, nº 3, Mayo 1998. [Disponible el 12/05/2015 en URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=&c=31>]

Osorio, A., Wills, A., y Muñoz, A. (2013). Caracterización de co-productos de la industria del fileteado de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) y trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en Colombia. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 60 (3), 45-47.

Opheim, M., Slizyté, R., Sterten, H., Provan, F., Larssen, E y Kjos, N. (2015). Hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) rest raw materials, effect of raw material and processing on composition, nutritional value, and potential bioactive peptides in the hydrolysates. *Process Biochemistry*, 50(8), 1247-1257.

Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadeganb, A., Rasco, B., Safari, R., y Shahiri, H. (2009). The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115, 238–242.

Panyam, D., Y Kilara, A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends Food Sci Technol*, 7, 120–125.

Perea, A., Gómez, E., Mayorga, Y., y Triana, C. (2008). Caracterización nutricional de pescados de producción y consumo regional en Bucaramanga, Colombia. ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición, 58(1), 91-97.

- Pereira, P., Pablo, H., Vale, H., Pacheco, M.(2010). Combined use of environmental data and biomarkers in fish (*Liza aurata*) inhabiting a eutrophic and metal-contaminated coastal system – Gills reflect environmental contamination. *Marine Environmental Research*, 69, 53-62.
- Playle, R.C. (1998). Modelling metal interactions at fish gills. *Science of the Total Environment*, 1, 147–163.
- Portilla, M., Eraso, S., Galé, C., García, I., Moler, J. y Blanca, M. (2006). Manual práctico del paquete estadístico SPSS para Windows (3ª edición revisada). Universidad Pública de Navarra: Navarra.
- Rebeca, B., Peña, M., y Díaz, M.(1991). Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; yield and nutritional value. *J Food Sci*, 56, 309–314.
- Rao, M., Scelza, R., Acevedo, F., Diez, M y Gianfreda, L. (2014). Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere*, 107, 145–162.
- Ringo, E., Olsen, R. E., Mayhew, T. M. and Myklebust, R. (2003). Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture*, 227, 395-415
- Roca, P., Oliver, J., y Rodríguez, A., (2003), *BIOQUÍMICA, TÉCNICAS Y MÉTODOS*, Madrid, España, Hélice editorial, 144-146.
- Robert, M., Zatylny-Gaudin, C., Fournier, V., Corre, E., Le Corguillé, G., Bernay, B., y Henry, J. (2015). Molecular characterization of peptide fractions of a Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product hydrolysate and in vitro evaluation of antibacterial activity. *Process Biochemistry*, 50(3), 487–492.
- Rosado, R., y Erazo, A. (2000). Fundamentos de Acuicultura Continental. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. República de Colombia - Bogotá
- Sabeena, K., Lystbak, L., Nielsen, H., Jacobsen, C., Jakobsen, G., Johansson, I., y Jessen, F.(2014). Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. *Food chemistry*, 149, 326-334.
- Salazar, G. (2001). Fundamentos de acuicultura continental. Consideraciones generales sobre la acuicultura. INSTITUTO NACIONAL DE PEZCA Y ACUICULTURA (INPA), No, 1, 30p.
- Shahidi, F., y Janak, K. (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends Food Sci. Technol*, 12, 435– 464.

- Shikha, K., Alvarez, C., Kumar, P., O'Donnell, C., y Tiwari, B. (2016). Effect of enzymatic hydrolysis on the production of free amino acids from boarfish (*Capros aper*) using second order polynomial regression models. *Food Science and Technology*, 68, 470-476.
- Silva, J., Ribeiro, K., Silva, J., Cahú, T., y Bezerra, R. (2014). Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. *Animal Feed Science and Technology*, 196, 96-106.
- Slizytė, R., Dauksas, E., Falch, E., Storro, I., y Rustad, T. (2005). Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem*, 40, 1415–1424.
- Slizytė, R., Rustad, T., y Storro, I. (2005). Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. *Process biochemistry*. 40(12). 1415-1424.
- Souissi, N., Bougatef, A., Triki, Y., y Nasri, M. (2007). Biochemical and functional properties of *Sardinella (Sardinella aurita)* by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*, 45, 187–194.
- Suarez, C. (2010). Obtención de hidrolizado de proteína de pescado a partir de tilapia roja (*Oreochromis spp*) (Tesis de especialista en ciencia y tecnología de alimentos). Universidad Nacional De Colombia, Bogotá D.C.
- Tavaro, O. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1–11.
- Teien, H., Kroglund, F., Atland, A., Rosseland, B., y Salbu, B. (2006). Sodium silicate as alternative to liming-reduced aluminium toxicity for Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) in unstable mixing zones. *Science Total Environ*, 358(3), 151–163.
- Tonon, R., Dos Santos, B., Couto, C., Mellinger, C., Brígida, A., y Cabral, L.(2016). Coupling of ultrafiltration and enzymatic hydrolysis aiming at valorizing shrimp wastewater. *Food Chemistry*, 198, 20-27.
- Torres, G., González, S., y Peña, S. (2010). Anatomical, Histological and Ultrastructural Description of the Gills and Liver of the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Int. J. Morphol*, 28(3), 703-712.
- Valencia, P., Flores, S., Pinto, M., y Almonacid, S. (2016). Analysis of the operational strategies for the enzymatic hydrolysis of food proteins in batch reactor, *Journal of Food Engineering*, 176,121–127.

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.

Vannabun, A., Ketnawa, S., Phongthai, S., Benjakul, S., y Rawdkuen, S.(2014). Characterization of acid and alkaline proteases from viscera of farmed giant catfish. *Food Bioscience*, 6, 9-16.

Wald, M., Schwarz, K., Rehbein, H., Bubmann, B., y Beermann, C. (2016). Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. *Food Chemistry*, 205, 221-228.

Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Penjamras, P., y Kristinsson, H. G. (2014). Chemical compositions and muddy flavour/odour of protein hydrolysate from Nile tilapia and broadhead catfish mince and protein isolate. *Food Chemistry*, 142, 210–216.

Zugarramurdi, A. Parin M.A. and Lupín H.M., 1993. Manual on Economic Engineering Applied to the Fish Industry, FAO/ GOVERNMENT OF DENNMARK COOPERATIVE PROGRAMME, Roma, pp 1-276.



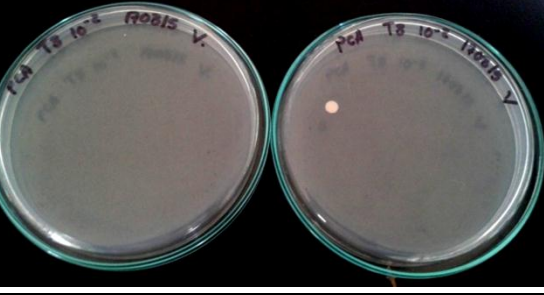
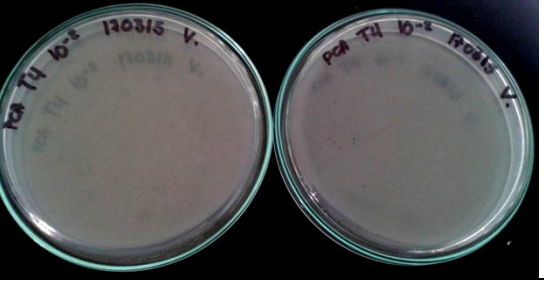
ANEXOS

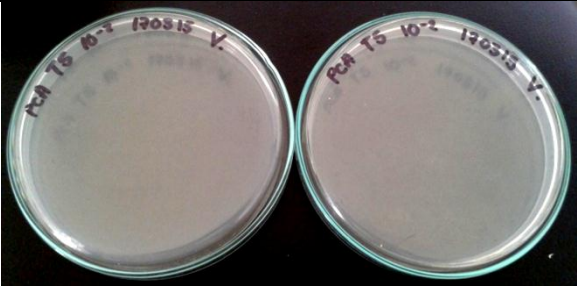
Anexo 1. Bitácora del muestreador

Variables	Comentarios
Nombre del Muestreador	Lina Fernanda Restrepo Buesaquillo
Altitud de sitio de muestreo (lectura del GPS) y Coordenadas del sitio de muestreo (lectura del GPS).	Latitud norte: 2,37° Longitud oeste: 76,21° Altura: 2527 m sobre el nivel del mar Temperatura: 15°C.
Fecha y Hora de captura	3:00 A.M
Identificación taxonómica	Reino: Animal Phylum: Chordata Subphylum: Vertebrata Superclase : Pisces Clase: Osteichthyes Subclase: Actinopterygii Orden: Salmoniformes Familia: Salmonidae Subfamilia: Salmoninae Género: Oncorhynchus Especie: mykiss Nombre Científico: Oncorhynchus mykiss
Nombre común	Trucha arco iris
Largo, ancho y peso promedio de la trucha	Largo: 30-35 cm Ancho: 7 – 9 cm Peso promedio: 400 g
Patrones de coloración	Normales para la especie

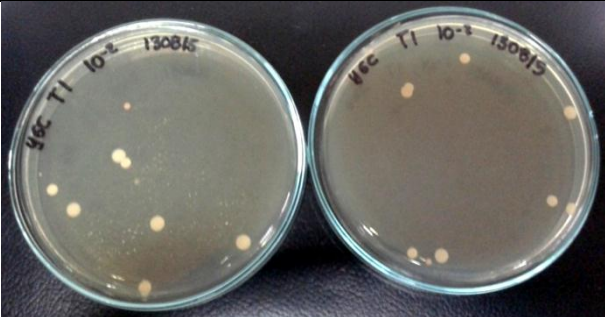
Anexo 2. Recuento microbiológico

MESOFILOS

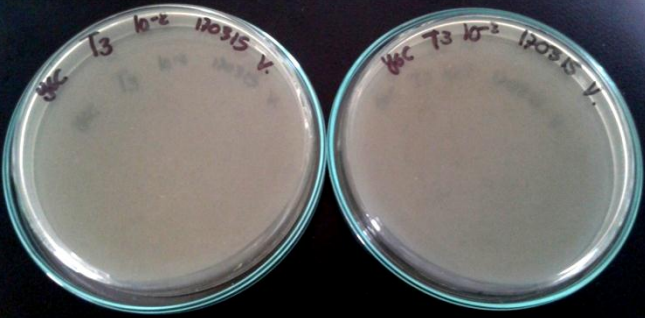
<p>T1</p> <p>VISCERAS SIN PROCESAR</p>			
<p>T2</p> <p>LICUADO DE VISCERAS</p>			
<p>T3</p> <p>Licuado de vísceras después de cocción a 65°C por 15 minutos</p>			
<p>T4</p> <p>Licuado de vísceras después de cocción a 65°C por 30 minutos</p>			

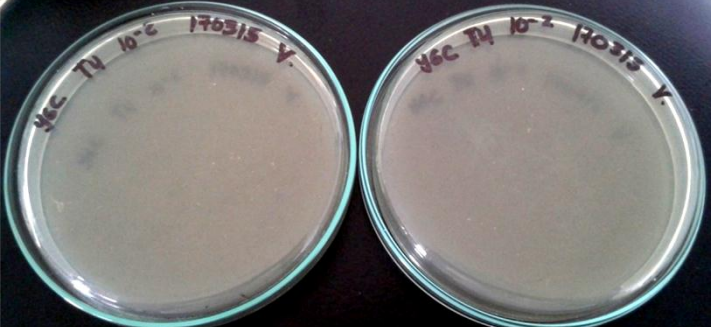
<p>T5</p> <p>Licudo de vísceras después de cocción a 80°C por 15 minutos</p>	
---	--

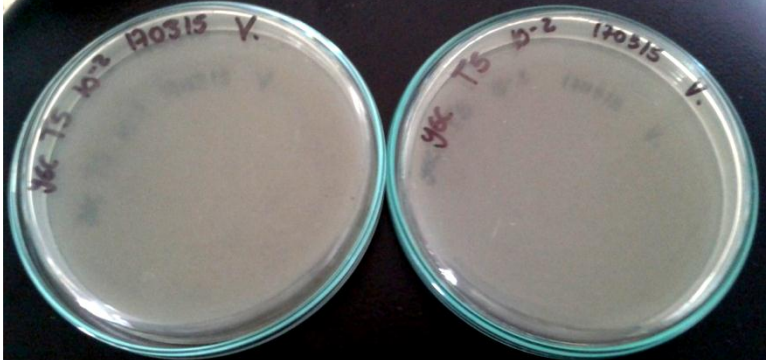
LEVADURAS

<p>T1</p> <p>VISCERAS SIN PROCESAR</p>	
---	---

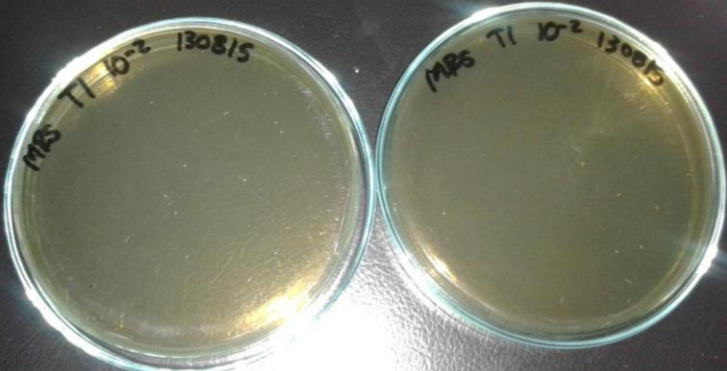
<p>T2</p> <p>LICUADO DE VISCERAS</p>	
---	--

<p>T3</p> <p>Licudo de vísceras después de cocción a 65°C por 15 minutos</p>	
---	--

<p>T4</p> <p>Licuada de vísceras después de cocción a 65°C por 30 minutos</p>	
--	--

<p>T5</p> <p>Licuada de vísceras después de cocción a 80°C por 15 minutos</p>	
--	--

BACTERIAS ACIDO LACTICAS

<p>T1</p> <p>VISCERAS SIN PROCESAR</p>	
---	--