

OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS ACTIVOS A PARTIR DE LA HIDRÓLISIS  
ENZIMÁTICA DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

EDIER GAVIRIA ACOSTA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2017

OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS ACTIVOS A PARTIR DE LA HIDRÓLISIS  
ENZIMÁTICA DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

EDIER GAVIRIA ACOSTA

Trabajo de grado presentado como  
requisito para optar al título de Magíster en Ciencias Químicas

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

UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2017

## CONTENIDO

RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	13
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	16
1.1. Proteínas.....	16
1.2. Proteínas de pescado.....	16
1.3. Subproductos piscícolas.....	18
1.4. Hidrólisis enzimática una alternativa para el uso de subproductos.....	20
1.4.1. Métodos para la determinación de grado de hidrólisis.....	25
1.5. Péptidos activos.....	26
1.5.1. Péptidos activos a partir de hidrólisis enzimática de subproductos piscícolas.....	28
1.5.2. Péptidos con capacidad antioxidante (CA).....	29
1.5.3. Péptidos con actividad antimicrobiana (AAM).....	31
1.6. Caracterización de péptidos activos.....	33
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
3. OBJETIVOS.....	36
3.1. Objetivo general.....	36
3.2. Objetivos específicos.....	36
4. METODOLOGÍA.....	37
4.1. LOCALIZACIÓN.....	37
4.2. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE VÍSCERAS DE PESCADO.....	37
4.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS.....	38
4.4. INACTIVACIÓN DE ENZIMAS ENDÓGENAS DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS POR TRATAMIENTO TÉRMICO.....	40
4.4.1. Determinación de la inactivación de carga enzimática en vísceras de trucha.....	41
4.4.2. Determinación de la Inactivación de carga microbiana en vísceras de trucha.....	42

4.5. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS .....	44
4.5.1. Obtención de aislado proteico .....	44
4.5.2. Diseño experimental para grado de hidrólisis .....	45
4.6. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CA).....	47
4.6.1. Método ABTS.....	47
4.6.2. Método DPPH .....	48
4.6.3. Diseño experimental actividad antioxidante .....	49
4.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA (AAM) .....	50
4.7.1. Preparación y activación de cepas patógenas .....	50
4.7.2. Medida de actividad antimicrobiana .....	51
4.8. DETERMINACIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES DE PÉPTIDOS POR ELECTROFORESIS SDS-PAGE.....	52
4.9. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE PÉPTIDOS ACTIVOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A MASAS.....	53
4.9.1. Parámetros de análisis para fuente de ionización HESI y detector Orbitrap®.....	54
4.9.2. Condiciones cromatográficas .....	54
4.9.3. Pesos moleculares de péptidos activos en hidrolizados proteicos de subproductos de trucha .....	55
5. ANÁLISIS Y RESULTADOS.....	56
5.1. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE VÍSCERAS DE PESCADO .....	56
5.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS.....	57
5.3. INACTIVACIÓN DE ENZIMAS ENDÓGENAS DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS POR TRATAMIENTO TÉRMICO.....	58
5.3.1. Inactivación carga enzimática .....	59
5.3.2. Inactivación carga microbiológica.....	61
5.4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS .....	62
5.4.1. Obtención de aislado proteico .....	62
5.4.2. Diseño experimental para grado de hidrólisis .....	64
5.5. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CA).....	69

5.5.1. Métodos ABTS .....	69
5.5.2. Método DPPH .....	71
5.5.3. Medida de la capacidad antioxidante y diseño experimental .....	72
5.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA (AAM) .....	80
5.6.1. Seguimiento de actividad antimicrobiana y diseño experimental .....	84
5.7. DETERMINACIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES DE PÉPTIDOS POR ELECTROFORESIS SDS-PAGE.....	86
5.8. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE PÉPTIDOS ACTIVOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A MASAS.....	88
5.8.1. Parámetros de análisis para fuente de ionización HESI y detector Orbitrap®.....	88
5.8.2. Condiciones cromatográficas .....	90
5.8.3. Pesos moleculares de péptidos activos en hidrolizados proteicos de subproductos de trucha .....	91
6. CONCLUSIONES.....	97
7. RECOMENDACIONES .....	99
8. BIBLIOGRAFÍA .....	100

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Reporte de actividad antioxidante con diferentes proteasas. ....	22
Cuadro 2. Reporte de actividad antioxidante con diferentes proteasas. ....	23
Cuadro 3. Valores para la inactivación térmica de enzimas y microorganismo. ....	40
Cuadro 4. Curva de calibración-método TNBS. ....	41
Cuadro 5. Condiciones de actividad enzimática de Protamex®. ....	44
Cuadro 6. Factores y niveles diseño experimental GH. ....	45
Cuadro 7. Resumen diseño experimental grado hidrólisis. ....	46
Cuadro 8. Unidades experimentales diseño GH. ....	46
Cuadro 9. Factores y niveles diseño experimental CA. ....	49
Cuadro 10. Resumen diseño experimental Actividad antioxidante. ....	49
Cuadro 11. Diseño experimental Actividad antioxidante. ....	50
Cuadro 12. Parámetros para muestreo de vísceras de trucha. ....	56
Cuadro 13. Animales muestreados por estanque. ....	57
Cuadro 14. Análisis proximal de vísceras y filete de trucha arcoíris. ....	58
Cuadro 15. Datos curva de calibración método TNBS. ....	60
Cuadro 16. Actividad enzimática endógena después de tratamiento térmico. ....	60
Cuadro 17. Análisis microbiológico. ....	61
Cuadro 19. Análisis proximal de aislado. ....	63
Cuadro 20. Aminoácidos presentes en de vísceras y musculo de trucha. ....	64
Cuadro 21. Resultados diseño experimental-GH. ....	65
Cuadro 22. Análisis de Varianza para GH. ....	66
Cuadro 23. Valores óptimos de cada factor. ....	68
Cuadro 24. Datos curva de calibración ABTS. ....	70
Cuadro 25. Datos curva de calibración DPPH. ....	72
Cuadro 26. Porcentaje de inhibición radicales DPPH y ABTS. ....	74
Cuadro 27. Diseño experimental respuesta % inhibición. ....	74
Cuadro 28. Análisis de Varianza para DPPH. ....	75
Cuadro 29. Valores óptimos para la mayor CA. ....	75
Cuadro 30. Resultados diseño experimental, respuesta grado de hidrólisis. ....	77
Cuadro 31. Análisis ANOVA grado de hidrólisis. ....	78
Cuadro 32. Valores de los factores para maximizar el grado de hidrólisis. ....	78
Cuadro 33. Capacidad antimicrobiana de péptidos. ....	81
Cuadro 34. Distribución del porcentaje de aminoácidos de vísceras de trucha. ....	83
Cuadro 35. Diseño experimental para AAM. ....	85
Cuadro 36. Valores de Gas envolvente para la HESI. ....	89
Cuadro 37. Valores de S-Lens para el Orbitrap. ....	89

Cuadro 38. Valores de voltaje de spray para la HESI.....	89
Cuadro 39. Valores de la temperatura del gas auxiliar. ....	90
Cuadro 40. Valores de temperatura del ITT.....	90
Cuadro 41. Tiempos de retención y masas moleculares en aislado proteico. ....	92
Cuadro 42. Tiempos de retención y masas moleculares de péptidos con CA. ....	93
Cuadro 43. Tiempos de retención y masas moleculares de péptidos con AAM. ....	95

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Obtención de hidrolizados y péptidos de subproductos piscícolas. ....	21
Figura 2. Reacción ABTS. ....	29
Figura 3. Reacción de DPPH. ....	30
Figura 4. Medios de cultivo selectivos para el análisis microbiológico. ....	43
Figura 5. Inoculación de la muestra en los medios de cultivo selectivos. ....	43
Figura 6. Caldos y medios de cultivo. ....	51
Figura 7. Obtención de péptidos activos a partir de subproductos de trucha ....	55
Figura 8. Proceso de obtención de muestra de vísceras de trucha. ....	56
Figura 9. Limpieza de vísceras de trucha arcoíris. ....	57
Figura 10. Inactivación de enzimas endógenas. ....	59
Figura 11. Curva de calibración método TNBS. ....	59
Figura 12. Obtención de aislado proteico. ....	62
Figura 13. Actividad de enzima protamex®. ....	64
Figura 14. Superficie de respuesta para GH. ....	67
Figura 15. Grado hidrólisis Vs Tiempo. ....	69
Figura 16. Curva de calibración método ABTS. ....	70
Figura 17. Curvas de calibración DPPH. ....	71
Figura 18. Relación del GH y la capacidad antioxidante. ....	73
Figura 19. Superficie de respuesta para actividad antioxidante. ....	76
Figura 20. Superficie de respuesta para grado de hidrólisis. ....	79
Figura 21. Halos de inhibición generados por la AAM de péptidos. ....	80
Figura 22. AAM/GH Vs tiempo. ....	84
Figura 23. Seguimiento de AAM por turbidimetría. ....	86
Figura 24. Electroforesis. ....	87
Figura 25. Cromatograma de aislado proteico. ....	91
Figura 26. Cromatograma hidrolizado capacidad antioxidante. ....	92
Figura 27. Cromatograma hidrolizado actividad antimicrobiana. ....	94
Figura 28. Masa molecular de péptido presente en hidrolizado con AAM. ....	96



## LISTA DE LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

<b>% I</b>	Porcentaje de inhibición
<b>% p/p</b>	Porcentaje peso a peso
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µL</b>	Microlitro
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
<b>ACE</b>	Enzima convertidora de Angiotensina
<b>AMM</b>	Actividad antimicrobiana
<b>C</b>	Carbono
<b>CA</b>	Capacidad antioxidante
<b>Cal</b>	Calorías
<b>CV</b>	Coeficiente de variación
<b>Da</b>	Dalton
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>DPPH</b>	2,2- difenil-1-picrilhidracilo
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>GH</b>	Grado de hidrólisis
<b>h</b>	horas
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>M</b>	Molaridad
<b>mg</b>	Miligramos
<b>min</b>	minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MSR</b>	Método de superficie de respuesta
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>NMP</b>	Método del número más probable
<b>NTC</b>	Norma técnica colombiana
<b>OPA</b>	Ortoparafenilaldehído
<b>PIB</b>	Producto interno bruto
<b>Pm</b>	Promedio
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>TIC</b>	Corriente iónica total
<b>TNBS</b>	Ácido Trinitrobenceno sulfónico

**UFC** Unidades formadoras de colonias  
**UHPLC** Cromatografía de líquidos de ultra-alto rendimiento  
**VB** Valor biológico

## RESUMEN

La agroindustria piscícola es la base alimentaria en muchos países, en los últimos años se ha observado un importante incremento de la producción mundial, el aumento en consumo de pescado conlleva la generación de subproductos como: intestinos, estomago, hígado, sangre, cabezas y escamas, material poco apetecible y no comercial. Los subproductos del pez representan entre un 50 y 70% de su peso. Esta alta generación de subproductos ha creado graves problemas de contaminación ambiental, generando malos olores, contaminación a cuerpos de agua y propagación de enfermedades. Los hidrolizados de proteína se presentan como una alternativa para el uso de estos desechos, estos productos son obtenidos por el rompimiento de la proteína a fracciones de cadenas más cortas y aminoácidos libres, lo que les confiere diferentes propiedades físicoquímicas como capacidad emulsificante y espumante, en algunos casos se obtienen productos con actividad biológica, conocidos como péptidos activos, los cuales tienen algunas funciones fisiológicas en el cuerpo, tales como anticáncer, antioxidante, antimicrobiano, entre otras.

En esta investigación se obtuvieron péptidos con capacidad antioxidante (CA) y actividad antimicrobiana (AAM), por medio de un proceso hidrolisis usando la enzima comercial Protamex<sup>®</sup>, el sustrato fue proteína obtenida a partir de vísceras de trucha arcoíris cultivada en el municipio de Silvia-Cauca. La máxima capacidad antioxidante se obtuvo con un grado de hidrólisis (GH) del 57 %, mientras que valores de GH del 19 % mostraron capacidad antimicrobiana frente a *Aeromonas hydrophyla*. Los hidrolizados con CA y AAM fueron caracterizados por cromatografía líquida acoplada a masas en un rango de peso de 200 a 12000 Da.

**PALABRAS CLAVE:** Subproductos, Hidrolizados, Enzimas, Péptidos Activos, Orbitrap

## ABSTRACT

The fish agroindustry is the base food in many countries, In recent years has seen an important increase in world production, the increase in fish consumption carries the generation of by-products such as: guts, stomach, liver, blood, fish heads, fish scales, unpalatable and non commercial material. The fish by-products represent between 50% and 70% of its weight. This high generation of by products has created serious problems of environmental pollution, generating bad smells, water pollution and propagation of diseases. The Protein hydrolysates are presented as an alternative to use of these by products, The hydrolysates are obtained by the breaking of the protein to fractions of shorter chains and amino acids, which confers them different physicochemical properties like emulsifying and foaming capacity, In some cases it is obtained products with biological activity known as active peptides which have some physiological functions in the human body, such as anticancer, antioxidant, antimicrobial, among others.

In this research were obtained peptides with antioxidant capacity (AC) and antimicrobial activity (AAM) by means of a hydrolysis process using the commercial enzyme Protamex®, the substrate was protein obtained from viscera of rainbow trout cultivated in the municipality of Silvia Cauca. The maximum antioxidant capacity was obtained with a degree of hydrolysis (GH) of 57%, while values of GH of 19% showed antimicrobial capacity against *Aeromonas hydrophyla*. The hydrolysates with CA and AAM were characterized by liquid chromatography coupled to masses in a weight range of 200 to 12000 Da.

**KEYWORDS:** By-products, Hydrolysates, Enzymes, Active Peptides, Orbitrap.

## INTRODUCCIÓN

La agroindustria piscícola es una de las principales fuentes económicas en muchos países a nivel mundial, el pescado por su alto valor nutricional, en su mayoría aportado por el alto contenido de proteína y calidad de la misma (Tahergorabi, Beamer, Matak, & Jaczynski, 2012), se ha convertido en un alimento indispensable para la alimentación humana y animal. Sin embargo la producción piscícola genera subproductos, que corresponde entre un 50 y 70 del peso del animal, dentro de los que se encuentran; vísceras, hueso, escamas, cabezas y aletas (Olsen, Toppe, & Karunasagar, 2014). Esta alta generación de subproductos ha creado graves problemas de contaminación ambiental, generando malos olores, contaminación a cuerpos de agua y propagación de enfermedades (Roslan, Yunus, Abdullah, & Kamal, 2014). Algunas alternativas se han estudiado para el uso de estos subproductos, debido al contenido de proteína de alta calidad y a la presencia de aminoácidos y ácidos grasos esenciales, así como vitaminas y minerales, los subproductos de la agroindustria piscícola se han aprovechado en alimentos para especies menores, obtención de harina de pescado y fertilizante (Vidotti, Viegas, & Carneiro, 2003). Sin embargo recientes investigaciones han utilizado herramientas biotecnológicas logrando una significativa explotación del valor nutricional de estos subproductos, una de las técnicas más utilizadas es la hidrólisis de proteína y en particular la hidrólisis enzimática (Cai *et al.*, 2015; Chalamaiah, Dinesh kumar, Hemalatha, & Jyothirmayi, 2012; Goddard & Perret, 2005). Los hidrolizados de proteína son productos con innumerables beneficios para quienes los consumen, se ha demostrado que el hidrolizado de proteína aumenta la disponibilidad de aminoácidos esenciales como no esenciales, disminuyendo factores antinutricionales de algunos alimentos y mejorando la digestibilidad de su proteína. Este proceso se ha convertido en la base de la búsqueda de alimentos nutracéuticos (Cai *et al.*, 2015), algunas propiedades fisicoquímicas importantes de los hidrolizados de proteína son la capacidad emulsificante, espumante y aumento en la viscosidad, razones por las que han sido usados como aditivos alimentarios (Halldorsdottir, Sveinsdottir, Gudmundsdottir, Thorkelsson, & Kristinsson, 2014). Uno de los productos con un alto valor agregado obtenido a partir de la hidrólisis enzimática de subproductos de la agroindustria piscícola son los compuestos bioactivos, específicamente los péptidos activos; estas son fracciones proteicas, obtenidas por el rompimiento de los enlaces peptídicos de la proteína nativa, debido a su composición y estructura específica algunos péptidos obtienen características fisicoquímicas que le confieren diferentes actividades biológicas, lo que ha sido ampliamente estudiado y reportado (Chia, Wu, Chen, & Chi, 2010; Di Bernardini *et*

*al.*, 2011; Pane *et al.*, 2017; Samaranayaka & Li-Chan, 2011; Sarmadi & Ismail, 2010; Toopcham, Mes, Wichers, & Yongsawatdigul, 2017). Sin embargo el proceso de obtención de péptidos activos es un campo que debe ser estudiado, comenzando por considerar la proteína de origen, debido a que su estructura primaria y contenido particular de aminoácidos serán factores que dirijan la composición química que pueden tener los péptidos al final del proceso (Galla, Pamidighantam, Akula, & Karakala, 2012), por otro lado existen diferentes métodos de hidrólisis, entre los cuales se encuentran ácidos, básicos y enzimáticos. Los métodos ácidos y básicos se usan generalmente cuando se desea alto grado de hidrólisis, esto con el fin de obtener alimentos para dietas parentales o bien para ser como aditivos alimentarios con el fin mejorar propiedades tecnofuncionales de otros alimentos, cuando se desea llegar a péptidos con una determinada actividad, la forma más conveniente es el proceso enzimático, y para ello son necesarias proteasas, estas son enzimas capaces de romper enlaces peptídicos, dentro de las más reportadas se tienen: Alcalase<sup>®</sup>, papaína, pepsina, tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, pancreatina, Flavourzyme<sup>®</sup>, Pronasa, Neutrase<sup>®</sup>, Protamex<sup>®</sup>, bromelina, Criotin F<sup>®</sup>, Proteasa N<sup>®</sup>, Proteasa A<sup>®</sup>, Orientase<sup>®</sup>, Termolisina<sup>®</sup> y Validase<sup>®</sup> (Je, Park, Hwang, & Ahn, 2015; Lassoued *et al.*, 2015; Roslan *et al.*, 2014), con las cuales se reporta la obtención de péptidos activos a partir de proteína de animales de origen acuático (Harnedy & FitzGerald, 2012), es trascendental evaluar el costo real del proceso tanto de hidrólisis como de purificación y rendimiento, debido a que factores económicos son puntos críticos en procesos de obtención de compuestos bioactivos (Martínez-Alvarez, Chamorro, & Brenes, 2015; Sila & Bougatef, 2016).

El departamento del Cauca en los últimos años se ha convertido en un importante productor de pescado a nivel nacional, siendo la tilapia roja (*Oreochromis spp*) y la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) las principales especies cultivadas en los municipios de Suarez y Silvia respectivamente, actualmente se observa un importante crecimiento en la comercialización de filete de pescado a nivel departamental y nacional, lo cual tiene una incidencia directa con la cantidad de granjas o estaciones piscícolas en estas zonas, y las problemáticas de postproducción que los piscicultores enfrentan (Crepic, 2015). La contaminación ambiental por residuos piscícolas es evidente en el departamento, por lo que se debe buscar alternativas tecnológicas para el manejo y aprovechamiento de estos subproductos, su alto contenido en biomoléculas, ha conllevado a que diferentes investigadores busquen alternativas para su aprovechamiento, esta problemática es el eje central del proyecto "Alternativas para el uso de subproductos derivados de la agroindustria piscícola" financiado por el Sistema General de regalías, el cual busca darle un uso importante a los residuos piscícolas por medio de la obtención de

productos como alimento extruido, productos probióticos, harina y aceite de pescado. Sin embargo, el contenido de importantes biomoléculas en los subproductos piscícolas lleva a la búsqueda de desarrollos innovadores capaces de generar nuevos productos y conocimientos que tengan la capacidad de mitigar la problemática de producción y manejo ambiental que la piscicultura enfrenta explotando al máximo el potencial que los residuos piscícolas contienen y generando productos con alto valor agregado.

Estudios fisicoquímicos y nutricionales de los componentes presentes en subproductos piscícolas, tales como ácidos grasos poliinsaturados, polisacáridos, minerales, vitaminas, antioxidantes, proteínas y enzimas (Benhabiles *et al.*, 2012; Goosen, de Wet, Görgens, Jacobs, & de Bruyn, 2014), han demostrado un importante potencial nutricional y funcional, procesos como la fragmentación e hidrólisis de estas macromoléculas pueden generar nuevos compuestos con actividad biológica importante. Algunas investigaciones acerca de las proteínas obtenidas de la actividad piscícola y la hidrólisis de las mismas, reportan la obtención compuestos bioactivos, que al ser utilizados como suplemento alimenticio han mejorado parámetros saludables de la especie que la ingiere, como la resistencia a enfermedades de origen bacteriano y la supervivencia, incidiendo también de manera significativa en la ganancia de peso y el aumento de la tasa de crecimiento, logrando una disminución de los índices de mortalidad en la producción piscícola (Cai *et al.*, 2015; Galla *et al.*, 2012).

# 1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

## 1.1. Proteínas

Las proteínas son biopolímeros formadas por cadenas de aminoácidos, los cuales están unidos de forma covalente, estos enlaces son denominados enlaces peptídicos, solo una proteína puede contener cientos de aminoácidos con una estructura y secuencia específica, esto determina su función, ya sea haciendo parte de una estructura, un receptor o bien catalizando un sin número de reacciones metabólicas (Lehninger, Nelson, & Cox, 2008). Son las macromoléculas más importantes para el desarrollo de la vida, estas se están en la naturaleza en diferentes formas, tamaños y composición, cada proteína tiene una función específica, dentro de las más importantes se encuentran: expresar la información genética, ser componente estructural de los seres vivos, además de estar implicadas en todas las reacciones químicas del metabolismo celular, es así como en organismo vivos se tienen proteínas como el colágeno, la cual hace parte de la estructura de seres vivos, además de proteínas con capacidad catalítica más conocidas como enzimas, y hasta proteínas compuestas por no más de 20 aminoácidos implicadas en señales hormonales (Voet 2009). Además de funciones metabólicas, también cumplen con la tarea de proporcionar energía (4 Kcal/g), esta función está ligada a los monómeros que la componen, para la mayoría de seres vivos algunos aminoácidos son esenciales, los cuales no pueden ser sintetizados por el organismo y deben ser ingeridos en sus dietas, esta necesidad ha llevado a la búsqueda de fuentes de proteína (Delaney *et al.*, 2008), dentro de las que se destacan proteínas de origen vegetal y animal, esta última tiene un mayor valor biológico debido a que su composición en aminoácidos es similar a las proteínas corporales. Uno de los factores importantes para determinar si una proteína es de buena calidad es el valor biológico (VB), el cual se define como la “proporción de proteína absorbida y retenida, y por tanto es utilizada por el organismo”, dentro de los alimentos con proteínas con mayor VB se encuentran: los huevos (Chang *et al.*, 2017), la leche y el pescado, lo cual ha hecho que estos tres productos se conviertan en grandes cadenas productivas a nivel mundial.

## 1.2. Proteínas de pescado

El pescado es la base de alimentación en muchos países a nivel mundial, la alta calidad nutricional de sus componentes lo ha posicionado como el alimento



predilecto para diferentes comunidades. Una de las macromoléculas que componen el pescado es la proteína, la cual se ha comprobado que es de elevada calidad por su composición en aminoácidos esenciales como no esenciales (Sanz, García Gallego, & De la Higuera, 2000). Las proteínas presentes en el pescado se dividen en: proteínas estructurales como la actina, miosina, tropomiosina y actomiosina, que constituyen casi un 80% del contenido total de esta molécula en los peces, también se encuentran proteína sarcoplasmáticas dentro de las que están la mioalbúmina, globulina y enzimas, las cuales constituyen un 25 % del contenido proteico, por ultimo están las proteínas del tejido conectivo como el colágeno que representan entre un 3 % al 5 % del total de proteínas en el animal (Vidotti *et al.*, 2003). Estas características nutricionales y funcionales de las proteínas de pescado han llevado a la explotación de esta fuente para la alimentación humana y animal, a lo cual se le denomina acuicultura, la cual es de las bases de la evolución y existencia de algunas especies. 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 (Roslan *et al.*, 2014).

La acuicultura a nivel mundial genera 200.844 millones de empleos y aproximadamente el 12 % de ellos son mujeres que desempeñan papeles en la postcosecha. La producción para el año 2010 fue de 148 millones de toneladas de las cuales 55 millones fueron en acuicultura continental según FAO (FAO 2015a). Ésta producción está liderada por Asia y el Pacífico, donde sobresale China con más del 60% de la producción mundial, mientras que Ecuador, Perú y Brasil se han convertido en líderes en su región, América latina participa con el 3,10 % de la producción mundial, alrededor de 1.883.134 toneladas para el año 2010 (Merino, Bonilla, & Bages, 2013; FAO 2015b). 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, cuenta con uno de los índices más altos en biodiversidad y una amplia variedad de peces. 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. La acuicultura en Colombia es un renglón que participa con 3,35 % del sector de la agricultura, ganadería, silvicultura y pesca ésta línea económica ha evolucionado de manera positiva desde el año 1985, para el año 2009 su participación en el producto interno bruto PIB fue de 0,22 % y para el año 2011 fue del 0,7 % además se calcula que la cantidad de acuicultores en el país es de 29.400, empleando a nivel nacional aproximadamente

12.990 personas, de las cuales en el departamento del Cauca fueron 1.292 trabajadores segmentados en mano de obra familiar y no familiar, lo que convierte la acuicultura en un motor de la economía que impacta positivamente en la disminución del margen de desempleo nacional (Merino *et al.*, 2013).

### **1.3. Subproductos piscícolas**

Dentro de las especies importantes cultivadas en Colombia se encuentra la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), este es un pez de agua dulce, considerado una de las especies más trascendentales en la acuicultura de aguas continentales, este sector agropecuario, es considerado por la FAO ("Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura," 2015b), como el sector con mayor crecimiento a nivel mundial, en el 2008, la producción mundial de peces para el consumo humano fue de 52,5 millones de toneladas con un incremento del 8,4 % anual; en Colombia, la producción de trucha arcoíris es de aproximadamente 6795 toneladas, que corresponden al 11,36 % de la producción nacional, el importante crecimiento está relacionado con el uso de nuevas tecnologías en el área acuícola para la obtención de productos utilizables y "valiosos" como la carne del pescado, que es finalmente la que va a generar la retribución económica, ignorando casi por completo que estos procesos también generan subproductos tales como escamas, piel, cabezas y vísceras, los cuales no reciben la manipulación ni los tratamientos adecuados para su disposición final, es decir, estos subproductos son vistos solo como desperdicios y se desechan sin utilizar los protocolos propios para este proceso, generando así un problema ambiental de gran impacto, convirtiendo el entorno en el cual son arrojados en focos de contaminación hídrica y de suelos (Olsen *et al.*, 2014).

El término subproducto hace referencia a un producto remanente de un proceso principal, al cual no se le da uso (Ferraro *et al.*, 2013; Olsen *et al.*, 2014). En la piscicultura la generación de la mayor cantidad de subproductos se da con la consecución del producto final, en el caso de la trucha en la obtención del filete de pescado, desechando escamas, baba, sangre, vísceras (tripas, estómagos, hígados), equivalentes entre un 50 y 70 % del peso total del animal. Las vísceras no se han utilizado eficientemente y son consideradas como desechos; la inadecuada manipulación de los residuos, genera un grave problema de contaminación ambiental y una pérdida de proteínas (Kittiphattanabawon, Benjakul, Visessanguan, Nagai, & Tanaka, 2005; Martínez-Alvarez *et al.*, 2015).

En países cuya actividad piscícola esta industrializada a gran escala como Chile se han implementado nuevas tecnologías en la disposición de los residuos de pescado, contribuyendo con el medio ambiente, es así como hoy en día un importante subproducto del pescado como el aceite ha comenzado a ser utilizado en la fabricación de pinturas, barnices, resinas, entre otros (Batista, 1999). Esta alternativa ha sido adoptada por otros países latinoamericanos que ya han empezado a emplear los procedimientos adecuados para la manipulación y análisis de los subproductos del pescado que permitan hacer uso de estos, no solo para contribuir con el medio ambiente, sino para fines comerciales. En Colombia se han ido implementando procesos que permiten que dichos subproductos sean empleados como recursos útiles con diferentes aplicaciones, como lo son la preparación de concentrados para alimentación animal, actividades que actualmente están siendo implementadas en la producción de trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, cultivada en Silvia–Cauca (Cauca, 2015) la cual es de 783 toneladas por año. Otros métodos se han usado para la manipulación y procesamiento de vísceras de pescado, uno de ellos es la refrigeración y su posterior uso como fuente de proteína en dietas para animales; sin embargo, un almacenamiento prolongado, conlleva al enranciamiento debido a los ácidos grasos insaturados presentes en las vísceras (Olsen *et al.*, 2014). Como alternativa, es la inclusión de esta materia previamente tratada física y químicamente en alimentación para especies menores, dentro de los reportes se encuentran importantes resultados en la avicultura y acuicultura, encontrando aumento positivo de los parámetros zootécnicos y saludables, disminuyendo niveles de mortandad y generando productos atractivos para el consumidor (Goosen, de Wet, & Görgens, 2014; Goosen, de Wet, Görgens, *et al.*, 2014). Este tipo de resultados beneficiosos para la producción animal se originan en el tipo de proteína procedente de los subproductos agroindustriales, debido a que contiene un alto porcentaje de aminoácidos esenciales como no esenciales, además de fracciones proteicas con actividad biológica declarada (Tahergorabi *et al.*, 2012), las cuales pueden tener propiedades excepcionales a la hora de combatir enfermedades, actuar como opresores de patógenos o bien disparar señales metabólicas positivas de quien las consume, son estas razones por las cuales se han usado las proteínas contenidas en subproductos como fuente de partida en la búsqueda de alimentos nutraceuticos (Cai *et al.*, 2015).

#### **1.4. Hidrólisis enzimática una alternativa para el uso de subproductos**

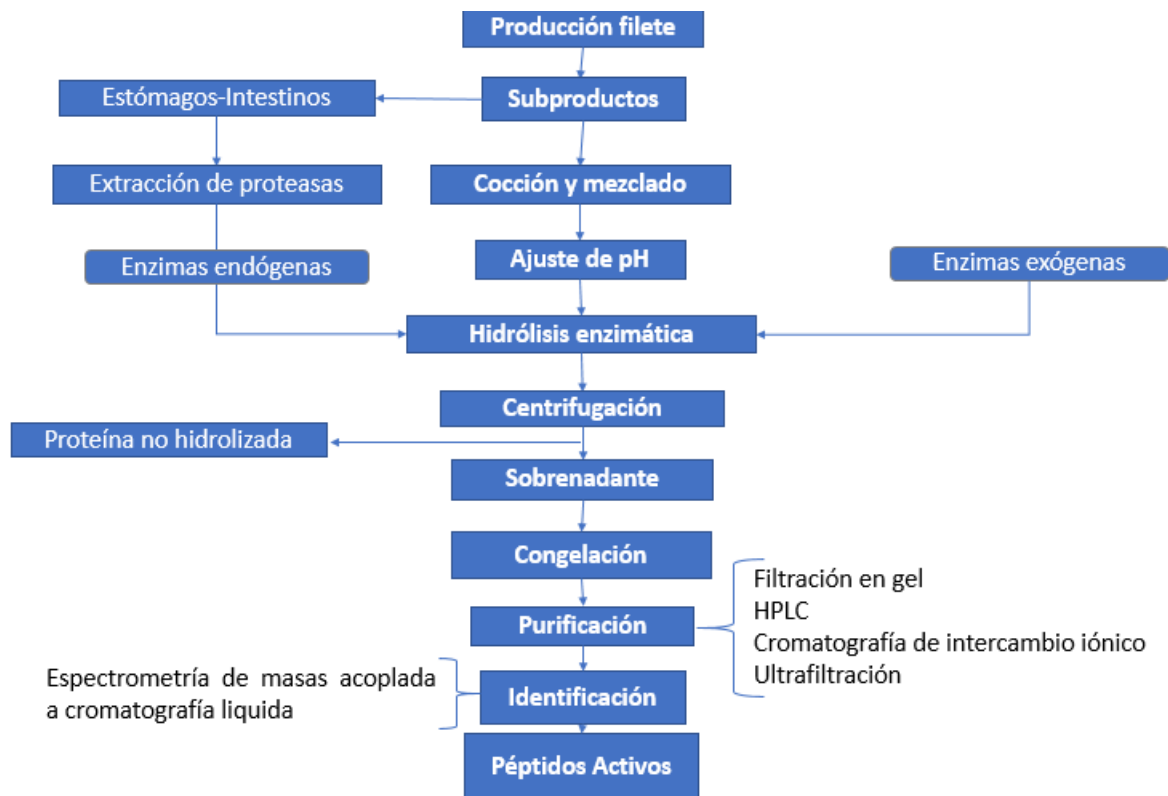
Desde el momento en el que se identificó el problema de contaminación por subproductos derivados de la agroindustria piscícola, diferentes soluciones se plantearon por parte de los pequeños y grandes productores. Debido a su contenido importante en proteína, grasa, vitaminas y minerales los subproductos son utilizados para la elaboración de abonos, por medio de proceso de compostaje, diferentes autores reportan varios beneficios en cultivos, debido al aumento de la disponibilidad de los nutrientes y la fácil absorción por parte de las plantas (Halldorsdottir *et al.*, 2014).

Otro de los usos es la inclusión de esta materia para alimentación de especies menores, previo tratamiento físico y químico, dentro de los reportes se encuentran importantes resultados en la avicultura y acuicultura, encontrando aumento positivo de los parámetros zootécnicos y saludables, disminuyendo niveles de mortandad y generando productos atractivos para el consumidor (Cai *et al.*, 2015). Este tipo de resultados beneficiosos para la producción animal se originan en el tipo de proteína procedente de los subproductos agroindustriales, su alto porcentaje de aminoácidos esenciales como no esenciales, además de fracciones proteicas con actividad biológica declarada (Khosravi *et al.*, 2015), Estudios recientes de Peinado (2016) estudiaron la inclusión de hidrolizados de subproductos de pescado y la generación de sabores al ser combinados con glucosa y aceite de pescado, se determinó que los hidrolizados contienen un alto contenido de leucina, lisina y ácido glutámico (Peinado, Koutsidis, & Ames, 2016).

En los últimos años diferentes investigaciones se han centrado en la búsqueda de alimentos que además de brindar energía metabólica tenga la capacidad de prevenir o combatir enfermedades (Je *et al.*, 2015), también conocidos como alimentos nutracéuticos. A pesar de ser desechados los subproductos agroindustriales contienen proteína con características específicas, en contenido de aminoácidos y secuencia de las mismas, las cuales pueden tener propiedades excepcionales a la hora de combatir enfermedades, actuar como opresores o bien disparar señales metabólicas positivas de quien las consume (Goosen, de Wet, & Görgens, 2014; Kotzamanis, Gisbert, Gatesoupe, Zambonino Infante, & Cahu, 2007; Volkoff, 2014), son estas razones por las que se ha usado la proteína contenida en subproductos como fuente de partida en la búsqueda de alimentos nutracéuticos, una de las rutas más utilizadas es la hidrólisis de proteínas a péptidos los cuales por su conformación específica y estructura característica en algunos casos adquieren actividad biológica, y se conocen como péptidos activos (Ko, Lee, Samarakoon, Kim, & Jeon,

2013; Robert *et al.*, 2015; Zhang, Duan, & Zhuang, 2012). Los hidrolizados de proteína se obtienen del rompimiento de la proteína a fracciones de cadenas de aminoácidos más cortas o bien aminoácidos libres, diferentes métodos se han utilizado para hidrolizar proteína de origen vegetal como animal, estos son; método ácido, método básico y método enzimático, los métodos ácidos y básicos son utilizados cuando se requiere llegar a un alto grado de fraccionamiento de la proteína, con lo cual se logran mejorar parámetros tecnofuncionales, como capacidad emulsificante, espumante y viscosidad, por lo que hidrolizados obtenidos por método básico y ácido se han usado como aditivos para otros alimentos, debido a su alto contenido de aminoácidos libres los hidrolizados por métodos ácidos y básicos pueden ser utilizados para dietas parentales, sin embargo la reacción es poco controlada y el fraccionamiento de realiza sin selectividad alguna, además de generar productos secundarios e incrementar el gasto de reactivos químicos.

**Figura 1.** Obtención de hidrolizados y péptidos de subproductos piscícolas.



La hidrólisis enzimática usa como principio el rompimiento selectivo de los enlaces peptídicos que unen los aminoácidos que componen la estructura primaria de la proteína, por medio de enzimas con capacidad proteolítica. En los últimos tiempos,

varios intentos se han hecho para la producción de hidrolizados de proteínas de pescado utilizando diferentes enzimas proteolíticas. En la Figura 1, se describe el proceso de obtención de hidrolizados y péptidos activos por medio de un proceso enzimático usando como sustrato los subproductos piscícolas, este proceso se puede llevar a cabo usando enzimas proteolíticas presentes en los subproductos (enzimas endógenas), como los son las pepsinas (Wald, Schwarz, Rehbein, Bußmann, & Beermann, 2016), sin embargo algunas de estas enzimas no son selectivas o bien su actividad se puede limitar por factores como el pH y la temperatura, por lo cual se hace necesario el adicionar proteasas comerciales, dentro de las más usadas se encuentran: Alcalase<sup>®</sup>, papaína, pepsina, tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, pancreatina, Flavourzyme<sup>®</sup>, Pronasa, Neutrase<sup>®</sup>, Protamex<sup>®</sup>, bromelina, Criotin F<sup>®</sup>, Proteasa N<sup>®</sup>, Proteasa A<sup>®</sup>, Orientase<sup>®</sup>, Termolisina<sup>®</sup> y Validase<sup>®</sup> (Hsu, 2010, Je *et al.* de 2009, Ngo *et al.*, 2010, Raghavan y Kristinsson, 2008; Ren *et al.*, 2008 y Samaranayaka y Li-chan, 2008). Diferentes reportes muestran este grupo de enzimas en la obtención de péptidos activos, Liu *et al.*, (2015) uso alcalasa para la obtención de péptidos activos (J. Liu *et al.*, 2015), algunas enzimas no específicas también han sido reportadas como lo es la pepsina (C. Wang *et al.* 2015), en el Cuadro 1, se observa la actividad antioxidante encontrada en hidrolizados obtenidos por acción de diferentes enzimas.

**Cuadro 1.** Reporte de actividad antioxidante con diferentes proteasas.

Enzima	Capacidad antioxidante (%) <sup>*</sup>
Alcalasa	48.46±0.92 <sup>b</sup>
Flavourzyme	40.72±1.51 <sup>b</sup>
Protamex	40.19±1.94 <sup>b</sup>
Pepsina	45.26±2.65 <sup>b</sup>
Papaína	68.62±2.61 <sup>a</sup>
Tripsina	45.52±3.16 <sup>b</sup>
Papaína: Flavourzyme: Protamex=2:3:1	70.24±2.82 <sup>a</sup>

Fuente (Q.-J. Yan *et al.* / Food Chemistry 179 (2015) 290–295)

Fuentes R. Liu *et al.* / Food Chemistry 167 (2015) 484–489

Sin embargo, las enzimas más usadas para la obtención de hidrolizados con uso en la alimentación animal son Alcalase, Savinase<sup>®</sup>, Protamex<sup>®</sup> (P. Garcia-Mora *et al.*, 2015), está a ultima se destaca por la producción de hidrolizados con buenas condiciones organolépticas. A nivel industria las más usadas son Alcalase, Flavourzyme, Neutrase<sup>®</sup>, Protamex, esto se debe al bajo costo que estas presentan frente a otras que tienen un valor económico alto. En Colombia el principal distribuidor es Novozymes, los cuales ofertan Flavourzyme, Neutrase<sup>®</sup>, Protamex, a precios muy asequibles, lo cual es conveniente en un proceso a nivel piloto e

industrial, además, que estas enzimas tienen un amplio rango de trabajo y a condiciones no muy agresivas de pH y temperatura como se muestra en Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Reporte de actividad antioxidante con diferentes proteasas.

Enzimas	condiciones óptimas	
	pH	Temperatura (° C)
Papaína	6,2	37
Pepsina	2,0	37
tripsina	7,6	37
Neutrased	6,0	50
Alcalasa	8,0	50
Kojizyme	6,0	40
Protamex	6,0	40
α-quimotripsina	7,8	37

Fuente: Ko, Lee, Samarakoon, Kim, Jeon (2013)

En la piscícolas Tabla 1. Hidrolizados obtenidos de subproductos piscícolas., se describen los hidrolizados obtenidos a partir de diferentes subproductos piscícolas

**Tabla 1.** Hidrolizados obtenidos de subproductos piscícolas.

Fuente	Subproducto	Característica	Referencia
<i>(Haliotis fulgens)</i>	Vísceras	Capacidad Antioxidante	(Je <i>et al.</i> , 2015)
<i>(Haliotis fulgens)</i>	Vísceras	Capacidad Antioxidante	(Zhou <i>et al.</i> , 2012)
<i>(Merluccius stenolepis ippoglossus)</i>	Piel	inhibidor de la DPP-IV	(Wang <i>et al.</i> , 2015)
<i>(Acipenser schrenckii)</i>	Piel	antioxidantes crioprotector	. (Nikoo, Benjakul, & Xu, 2015)
<i>(Navodon septentrionalis)</i>	Piel	Antioxidante	(Chi, Wang, Hu, <i>et al.</i> , 2015)
<i>(Sardina pilchardus)</i>	Musculo	microencapsulación de aceite	(Morales-Medina, Tamm, Guadix, Guadix, & Drusch, 2016)
<i>(Gazza minuta)</i>	Musculo	Alto contenido aminoácidos esenciales	(Klomklao, Kishimura, & Benjakul, 2013)
<i>(Navodon septentrionalis)</i>	Cabeza	Capacidad Antioxidante	(Nguyen, Pérez-Gálvez, & Bergé, 2012)
<i>(Thunnus albacares)</i>	Cabeza	Mejora parámetros zootécnicos	(Chi, Wang, Wang, Zhang, & Deng, 2015)
<i>(oreochromis spp)</i>	Hueso	Actividad inhibidora ACE-	(Akagündüz <i>et al.</i> , 2014)

Uno de los pasos importantes para llevar a cabo la hidrólisis de proteínas de subproductos piscícolas, es la selección de la enzima, para ello existen reportes bibliográficos donde se describen la obtención de hidrolizados para alimentación animal y péptidos activos, encontrando los siguientes productos: Alcalase, papaína, pepsina, tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, pancreatina, Flavourzyme, Pronasa, Neutrase, Protamex, bromelina, Criotin F, proteasa N, proteasa A, Orientase, termolisina y validase

Las vísceras de pescado son generadas durante el proceso de obtención de filetes, son una fuente potencial de proteína, la cual puede ser utilizada como materia prima para la producción de hidrolizados, que en algunas ocasiones resultan con propiedades excepcionales para diversas aplicaciones industriales (Klomklao *et al.*, 2013). Diferentes estudios reportan la obtención de hidrolizados enzimáticos a partir de vísceras de pescado (Villalba-Villalba *et al.*, 2013), obteniendo productos con valor agregado por su alta digestibilidad, lo que conlleva una mejor asimilación del contenido de aminoácidos, logrando mejorar parámetros productivos cuando estos hidrolizados se incluyen en alimentación de otras especies (Kechaou *et al.*, 2009; Ketnawa, Benjakul, Martínez-Alvarez, & Rawdkuen, 2014; Klomklao *et al.*, 2013). La piel de los peces es una importante fuente en macromoléculas como colágeno, rico en residuos de aminoácidos apolares, que en el momento de ser hidrolizados han arrojado resultados o bioactividad importante. Reportes han demostrado la obtención de actividad antioxidante de varias proteínas de piel de marinos, así como la obtención de hidrolizados de piel de carpa, con propiedades funcionales y crioprotectoras (Chi, Wang, Hu, *et al.*, 2015; Ketnawa, Martínez-Alvarez, Benjakul, & Rawdkuen, 2016; Nikoo *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). Hidrolizados de diferentes pieles de pescados de aguas frías y cálidas fueron estudiados por Wang *et al.*, (2015), donde se analizó la capacidad inhibidora de dichos hidrolizados sobre la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), la cual controla problemas causados por la de la diabetes (Wang *et al.*, 2015), se determinaron porcentajes de inhibición del 38,2 y 51,9% a una concentración de la muestra de 1 mg/ml, la caracterización de las fracciones mostró que los hidrolizados son ricos en ácidos imino.

A pesar de que las cabezas de pescados en su mayoría están constituidas por material calcinado, existen reportes en los cuales hidrolizados a partir de este tipo de materia han demostrado actividad biológica. Chi *et al.*, (2015) hidrolizó proteínas de cabezas de *Navodon septentrionalis*, los subproductos fueron tratados con papaína como enzima proteolítica, como resultados se obtuvieron tres fracciones proteica con capacidad antioxidante, las cuales se caracterizaron como: Trp-Glu-Gly-Pro-Lys (WEGPK), Gly-Pro-Pro (GPP), y Gly-Val-Pro-Leu-Thr (GVPLT), con un



masa molecular de 615,69, 269,33, y 485,59 Da, respectivamente (Chi, Wang, Wang, *et al.*, 2015).

Se han llevado a cabo estudios sobre la inclusión de hidrolizados de cabeza de atún en dietas para el crecimiento de *Penaeus vannamei*, mostrando aumento en parámetros productivos (Nguyen *et al.*, 2012). Hidrolizados a partir de cabezas de salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*), ha demostrado tener importantes propiedades funcionales y nutricionales, además hidrolizados de *Sardinella aurita*, mostraron que a mayor grado de hidrólisis se obtuvo una importante actividad antioxidante (Bougatef *et al.*, 2010); (Di Bernardini *et al.*, 2011; Morales-Medina *et al.*, 2016).

Se puede pensar que los huesos de pescado no serían la mejor fuente de proteína, estudios reportan la obtención de péptidos activos obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática de proteínas presentes en huesos de pescado. Propiedades antioxidantes se han reportado a partir de hidrolizados obtenidos de bacalao (*Gadus morhua*), otros autores reportan la purificación y caracterización de un péptido antioxidante obtenido de la hidrólisis enzimática de proteína presente en la espina dorsal de atún, estos resultados se deben a la presencia de proteínas de alta calidad que se encuentran ligadas a los huesos de peces, así como la proteína que compone la medula ósea de estos animales (Akagündüz *et al.*, 2014). Uno de los factores más importantes a evaluar en hidrolizados enzimáticos es el grado de hidrólisis (GH), el cual hace referencia a la cantidad de enlaces peptídicos hidrolizados por parte de la enzima, respecto al total de enlaces peptídicos que componen la proteína nativa, es tal la importancia de este valor que se han desarrollado diferentes métodos para la cuantificación de esta valor (Adler-Nissen & Olsen, 1982).

#### **1.4.1. Métodos para la determinación de grado de hidrólisis**

Los métodos más utilizados para la determinación del grado de hidrólisis de proteínas se basan en la cuantificación espectrofotométrica de los grupos amino libres, la valoración con ninhidrina, el método de ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS), y OPA, han sido ampliamente reportados en la actualidad (Benítez *et al.*, 2008).

La valoración con ninhidrina, se basa en la reacción de grupos aminos de la proteína con este reactivo, sin embargo, este ensayo presenta muchas interferencias entre ellas el amonio, lo cual la hace poco útil como método de valoración. La

determinación del grado de hidrólisis con o-ftalaldehído (OPA) se baso en la reacción de los  $\alpha$ -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).

Uno de los métodos más utilizados por su alta sensibilidad y pocos interferentes en la reacción es la determinación de  $\alpha$ -aminos con ácido trinitrobencensulfónico (TNBS): Basado en la reacción de los grupos  $\alpha$ - amino con el 2,4,6-ácido trinitrobencensulfónico, para formar un compuesto cromóforo que tiene un punto máximo de absorbancia a 410 nm (Spellmana *et al.*, 2003); Buena sensibilidad y reproducibilidad.

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  $\text{NO}_2$  y el  $\text{SO}_3^{2-}$  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 cómo 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 410 nm. El final de la reacción se da con adición de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , 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.

## 1.5. Péptidos activos

Los compuestos bioactivos se definen como sustancias que en bajas concentraciones pueden tener beneficio para la salud de quien los consume, son innumerables los compuestos que han reportado algún tipo de actividad, desde compuestos con estructuras simples como algunos aldehídos y ácidos orgánicos hasta ácidos grasos de cadena larga, algunos polisacáridos y fracciones de proteína, estos últimos son más conocidos como péptidos activos (S.-K. Kim & Wijesekara, 2010).

Los péptidos activos son fragmentos específicos de proteína, que además de ser fuente de energía y nitrógeno, y cumplir con actividad fisiológica, poseen una actividad biológica demostrada, dentro de las que se destacan; actividad antioxidante, antihipertensivos, antimicrobianos, anticoagulantes, antidiabéticos y anticáncer (Udenigwe, 2014). Aunque la relación estructura y actividad de la mayoría de péptidos aún no ha sido plenamente establecida, varias características estructurales se han identificado, las cuales parecen influir en la acción biológica de los péptidos (Sarmadi & Ismail, 2010). Para hacer un estudio profundo de la actividad de los péptidos se debe tener en cuenta dos factores importantes, en primer lugar, la proteína de origen, y en segundo lugar el método de obtención. Cuando se habla de proteína de origen, se tiene dos importantes fuentes, proteína de origen vegetal y proteína de origen animal. La mayoría de estudios que se basan en proteína de origen vegetal, usan como materia prima semillas con un alto contenido de proteína, como lo es la lenteja, la soja, y en los últimos años la quinua, esta proteína al ser sometida a procesos de hidrólisis enzimático ha generado importantes resultados, con actividades anticáncer, antihipertensivo, antioxidante, antimicrobiana, entre otras, sin embargo la mayoría de investigaciones se han centrado en la hidrólisis de proteínas presentes en animales de origen acuático, se cree que este tipo de proteína contiene características estructurales específicas, así como un contenido particular de aminoácidos esenciales como no esenciales, estas características fueron adquiridas por el medio en el que estos evolucionaron, así como su actividad metabólica.

Es importante resaltar que se han identificado péptidos con actividad biológica, de origen animal o vegetal, obtenidos por extracción sin llevar a cabo procesos de hidrólisis, este tipo de péptidos pueden ser originados por los sistemas vivos como parte de su metabolismo, con el fin de cumplir acciones fisiológicas, metabólicas y en algunos casos hasta de protección contra otras especies (Ko *et al.*, 2013).

Cuando se habla del método de obtención, se ha descrito anteriormente los más usados, como son los químicos y enzimáticos, sin embargo, como se mencionó si se quiere tener un verdadero control sobre el proceso, es el método enzimático el que se perfila como la mejor opción cuando la bioactividad es el resultado que se busca. Para ello existen un amplio número de enzimas con capacidad proteolítica la cuales se describen a continuación: Alcalase<sup>®</sup>, papaína, pepsina, tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, pancreatina, Flavourzyme<sup>®</sup>, Pronasa, Neutrase<sup>®</sup>, Protamex<sup>®</sup>, bromelina, Criotin F<sup>®</sup>, Proteasa N<sup>®</sup>, Proteasa A<sup>®</sup>, Orientase<sup>®</sup>, Termolisina<sup>®</sup> y Validase<sup>®</sup>.

### 1.5.1. Péptidos activos a partir de hidrólisis enzimática de subproductos piscícolas

Como se ha descrito una de las principales fuentes para la producción de péptidos activos son los animales de origen marino (Harnedy & FitzGerald, 2012), esto por su particular composición, característica que se conserva en los subproductos que se generan por la comercialización de filete de pescado a nivel mundial, al igual que la materia comercializable (musculo de pescado), los subproductos como vísceras, piel, huesos y cabezas son rico en proteínas, grasas, minerales y vitaminas, que se están sub utilizando o bien generando problemas ambientales (Ko *et al.*, 2013; Li & Li, 2013; Nazeer, Sampath Kumar, & Jai Ganesh, 2012; Zhang *et al.*, 2012). Debido a su composición particular investigaciones se han centrado en el análisis y procesamiento de subproductos, con el fin de generar un uso a este material y dar un gran valor agregado (Schlueter *et al.*, 2014). Los péptidos activos a partir de subproductos de la agroindustria piscícola son uno de los compuestos prometedores a nivel industrial, debido al crecimiento en la producción de alimentos que no solo cumplan con la función de brindar energía, sino que tengan la capacidad de prevenir y combatir enfermedades (alimentos nutracéuticos), los hidrolizados de proteína a partir de subproductos se convierten en la base de esta industria en auge. A continuación, se describen péptidos activos obtenidos a partir de diferentes subproductos del área piscícola.

**Tabla 2.** Péptidos activos obtenidos de subproductos piscícolas.

Fuente	Subproducto	Actividad	Secuencia	Referencia
<i>(Oreochromis niloticus)</i>	Animal completo	inhibidores ECA	MILLLFR LNLQDFR	(Toopcham, Roytrakul, & Yongsawatdigul, 2015)
<i>(Oreochromis niloticus)</i>	Cabeza, huesos y vísceras	Antimicrobiana	-	(Robert <i>et al.</i> , 2015)
<i>(Scomber scombrus)</i>	Vísceras	Antibacteriana	SIFIQRFTT RKSGDPLGR AKPGDGAGSGP R	(Ennaas, Hammami, Beaulieu, & Fliss, 2015b)
<i>(P. olivaceus)</i>	Musculo	Antioxidante	VCSV-CAAP	J.Y. Ko <i>et al.</i> 2013
<i>(Oreochromis niloticus)</i>	piel	Antioxidante	EGL-YGDEY	Y. Zhang <i>et al.</i> 2012
<i>(Theragra chalcogramma)</i>	Hueso	Antioxidante		. (Je, Park, & Kim, 2005)

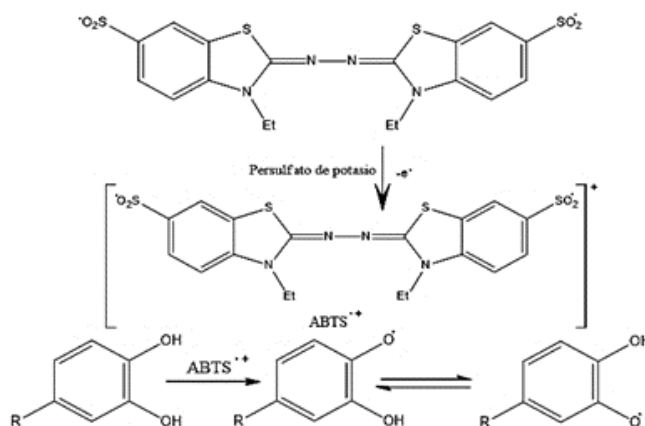
### 1.5.2. Péptidos con capacidad antioxidante (CA)

Una de las actividades más importantes y estudiadas de péptidos obtenidos por medio de hidrólisis enzimática es la capacidad antioxidante, la cual se presume está relacionada con residuos de histidina, cisteína, metionina, leucina y tirosina, los cuales tienen la capacidad de absorber radicales libres.

La importancia de los péptidos con capacidad antioxidante se basa en sus potenciales usos en la industria alimentaria tanto de animales como humanos y en el área farmacéutica, sin embargo, la relación entre la estructura y la actividad sigue siendo poco clara, especialmente en péptidos antioxidantes que llevan a cabo reacciones vía radicalaria. Un sin número de péptidos antioxidantes se reporta en la actualidad obtenidos a partir de proteína de pescado, su capacidad antioxidante está determinada por diferentes dentro de los que se encuentran: equivalente antioxidante (TEAC), capacidad de absorción radical oxígeno (ORAC), y radical superóxido (SOR), absorción de radicales DPPH Y ABTS.

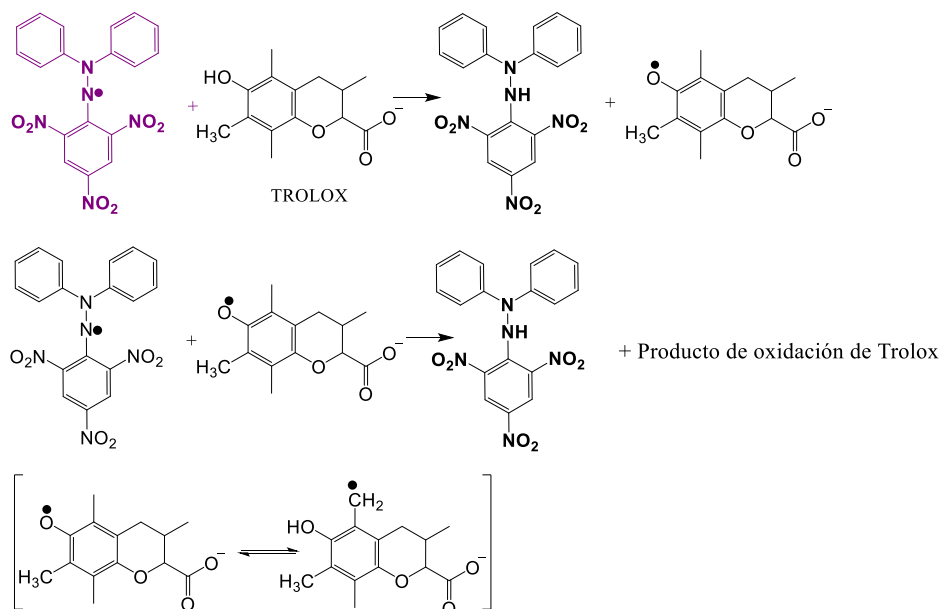
El ensayo de ABTS consiste en la técnica de decoloración del radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico, el cual es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes, este presenta un máximo de absorbancia a 734 nm, lo que se aprovecha para realizar un análisis espectrofotométrico. La capacidad antioxidante se determina calculando el porcentaje de inhibición de radicales al ser interpolado con una curva de inhibición usando generalmente Trolox como patrón de referencia (Ko *et al.*, 2013; Li & Li, 2013).

**Figura 2.** Reacción ABTS.



La determinación de capacidad antioxidante por DPPH, consiste en la absorción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, este radical es muy usado debido a su estabilidad y a que presenta un máximo de absorbancia a 517 nm, lo cual se aprovecha para calcular el porcentaje de inhibición o expresar los resultados respecto a patrones de referencia (Zhang *et al.*, 2012).

**Figura 3.** Reacción de DPPH.



Diferentes estudios reportan la obtención de péptidos con capacidad antioxidante a partir de subproductos piscícolas, Chi *et al.*, (2015) reportó la obtención de hidrolizado de subproductos de *Navodon septentrionali*, con capacidad antioxidante, para ello se usó como enzima proteolítica papaína, los péptidos con capacidad antioxidante se secuenciaron como Trp-Glu-Gly-Pro-Lys (WEGPK), Gly-Pro-Pro (GPP), y Gly-Val-Pro-Leu-Thr (GVPLT), la mayor actividad antioxidante fue mostrada por la secuencia GPP con una actividad de absorción de radical DPPH de E<sub>50</sub> 1,927 mg/ml, para la absorción de radicales hidroxilo la actividad dio como resultado CE<sub>50</sub> 2,358 mg/ml y de radicales ABTS CE<sub>50</sub> 2,472 mg/ml), como se describe en las secuencias estas están compuestas por los residuos de aminoácidos hidrófobos y aromáticos (Chi, Wang, Wang, *et al.*, 2015). Existe el uso de otras especies para la obtención de péptidos antioxidantes, como es el caso del bacalao, hidrolizados de proteínas de bacalao se fraccionaron por medio de ultrafiltración encontrando fracciones entre 5 kDa, 3-5 kDa y <3 kDa, estas fracciones mostraron importante actividad antioxidante determinada por métodos *in*

*vitro* como DPPH e inhibición de la oxidación de lípidos, investigación realizada por Sabeena y colaboradores (Sabeena Farvin *et al.*, 2014). Otros investigadores identificaron péptidos con capacidad antioxidantes.

Las aletas de anchoa también han sido usadas para la obtención de péptidos antioxidantes, la actividad de las fracciones se determinó por el método DPPH y caracterizadas por HPLC junto con ESI-ms, las secuencias de los péptidos con mayor capacidad antioxidante son: AGDDARPA (771,35 Da), ESAGLHE (741,33 Da), NKVKGELD (901,45 Da), TLWSGAGQTVNT (1233,63 Da), EMSAGLHE (872,37 Da)(Song, Wei, Ruan, & Luo, 2015).

### **1.5.3. Péptidos con actividad antimicrobiana (AAM)**

Los diferentes riesgos a los que actualmente se exponen todas las especies debido al cambio climático y continua evolución de microorganismos patógenos, ha llevado a la búsqueda de nuevos medicamentos o bien fármacos que ayuden a combatir enfermedades causada por dichos riesgos, los animales acuáticos son una fuente de estructuras proteicas capaces de combatir o tratar algunas cepas patógenas, estas estructuras se conocen como péptidos antimicrobianos (Rajanbabu & Chen, 2011), estos son fracciones de proteínas pequeñas con masas moleculares <10 kDa según Alvares *et al.*, (2014) (Álvarez *et al.*, 2014; Battison *et al.*, 1992), otros autores reportan rangos moleculares de entre 200 y 3.624 Da (Beaulieu *et al.*, 2013; Doyen *et al.*, 2012; Robert *et al.*, 2015; Sila *et al.*, 2014). Basándose en el peso medio de un aminoácido de aproximadamente 110 Da (Beaulieu *et al.*, 2013), se puede suponer que contienen aproximadamente 2 a 33 aminoácidos.

Existen algunos modelos de la actividad antimicrobiana, el primero conocido como "barrel-stave", describe la formación de poros transmembranales, los cuales son generados por péptidos en conformación hélice que se unen a la membrana celular, lo que conduce a una permeabilización de la misma, causando fugas de citoplasma (Bessin, Saint, Marri, Marchini, & Molle, 2004; Reddy, Yedery, & Aranha, 2004; Sarmadi & Ismail, 2010). En el segundo modelo o "wedget", se basa en el almacenamiento de lípidos entre hélices para formar un poro mixto, en el tercer modelo, los péptidos actúan como un detergente, generando una perturbación de la membrana, lo cual lleva a la generación de poros transitorios, provocando un daño en la membrana (Barzyk, Campagna, Więclaw, Korchowiec, & Rogalska, 2009). A pesar de lo descrito anteriormente existen muchas hipótesis sobre el accionar de los péptidos antimicrobianos las cuales incluyen: penetración de péptidos en las

células, la inducción de hidrolasas que descomponen la pared celular, perturbación de la función de la membrana, inhibición de la síntesis de componentes esenciales de la pared celular tales como ácidos nucleicos y proteínas, incluso la inhibición de la actividad enzimática (Alkhatib *et al.*, 2012), y aún más asombroso se han descubierto péptidos que pueden causar muerte bacteriana sin lisis celular detectable (Guzman *et al.*, 2010). A continuación, se muestran algunas investigaciones sobre la obtención de péptidos activos a partir de subproductos de animales acuáticos.

Ennaas *et al.*, (2015) planteó el aislar y caracterizar péptidos antibacterianos a partir de hidrolizados de subproductos de *Scomber scombrus* usando Protamex como enzima proteolítica. Los resultados muestran fracciones capaces de tener una inhibición parcial y total sobre bacterias Gram-positivas (*Listeria innocua*) y Gram-negativas (*Escherichia coli*), la secuencias se determinaron por RP-HPLC y se identificaron como: SIFIQRFTT (P4), RKSGDPLGR (P8.1), AKPGDGAGSGPR (p8.2) y GLPGPLGPAGPK (P11), por estos resultados se puede pensar que este tipo de hidrolizado sirven como un ingrediente antimicrobiano, tanto en alimentos funcionales y aplicaciones nutraceuticas (Ennaas *et al.*, 2015b).

Beaulieu (2015), estudio la hidrólisis de proteínas de *Saccharina longicuris* usando como enzima tripsina, se obtuvieron fracciones con un peso > 10 kDa, la cual se evaluó frente a la bacteria *Staphylococcus aureus*, mostrando importantes resultados respecto a la disminución de la tasa de crecimiento. El análisis por cromatografía líquida acoplada espectrometría de masas (LC-MS/MS) mostraron proteínas similares a proteínas como la ubiquitina e histonas, las cuales contienen un alto contenido de leucina. Estas secuencias peptídicas se sintetizaron químicamente y confirmaron su bioactividad, es importante mencionar que este estudio se realizó a proteína de una macroalga, sin embargo la proteína está formada en un medio acuático (Beaulieu, Bondu, Doiron, Rioux, & Turgeon, 2015).

Un importante estudio se llevó a cabo Robert *et al.*, (2015), quien investigó la caracterización molecular de hidrolizado de subproductos de tilapia, con el fin de evaluar su potencial nutricional en alimentos acuícolas (Robert *et al.*, 2015). La composición de aminoácidos y la composición proximal mostró que el hidrolizado tiene un alto contenido de aminoácidos esenciales, necesarios para la nutrición de peces carnívoros. El perfil de peso molecular, determinado por cromatografía de exclusión por tamaño (HPSEC) indicó que el hidrolizado se compone principalmente de polipéptidos (46,9%) y oligopéptidos (35,8%). También se caracterizó la fracción peptídica por NLC-ESI-MS/MS y MALDI-TOF/TOF. Se identificaron los péptidos



1374, y destacó una alta diversidad de oligopéptidos y polipéptidos. Además, se determinó la actividad antimicrobiana del hidrolizado de tilapia frente a patógenos como *Yersinia ruckeri* teniendo como resultado una importante inhibición del microorganismo, y en menor medida contra *Edwardsiella tarda* y *Bacillus megaterium*. (Robert *et al.*, 2015). Uno de los principales inconvenientes para la producción a nivel industrial de péptidos activos es la extracción y purificación. La mayoría de ensayos a nivel de laboratorio usan técnicas de extracción y purificación que son costosas, siendo las más usadas la cromatografía líquida, electroforesis y nanofiltración, que por su elevado valor no pueden ser llevados a escalas más grandes, estos factores siempre deben ser evaluados cuando el objetivo es producir péptidos activos, con el fin de buscar un punto de equilibrio entre el porcentaje de rendimiento, el costo de producción y su comercialización (Samaranayaka & Li-Chan, 2011).

#### **1.6. Caracterización de péptidos activos**

Los métodos más comunes para la purificación de péptidos incluyen ultrafiltración (UF), cromatografía de fase inversa (RPC), cromatografía de intercambio iónico (IEC), cromatografía de filtración en gel (GFC), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), estas se han utilizado ampliamente para caracterización de los péptidos activos. Sin embargo, la cromatografía líquida (LC) -acoplada a detectores de masas (MS) se ha postulado como una de las mejores técnicas para la identificación de péptidos (García-Mora *et al.*, 2017). La utilidad de detectores de masas en el análisis de péptidos reside en su capacidad para calcular la masa exacta de la molécula, un paso muy útil en la identificación y caracterización de péptidos y proteínas, además la ionización por electrospray (ESI) y ionización por láser (MALDI) son algunos de los métodos más comunes que se utiliza para la identificación de proteínas y péptidos (Shao, Zhang, & Sun, 2014). El mayor inconveniente se basa en que estos métodos tienen un valor económico elevado, y en la mayoría de casos son inalcanzables. Sin embargo, la producción industrial de péptidos bioactivos derivados de alimentos existe, una de las técnicas más usadas es la producción de reactores con membrana, los cuales se basan en llevar a cabo reacciones hidrolisis por baches, y posterior a esto hacer pasar el hidrolizado por membranas con características físicas o químicas específicas, con el fin de adsorber los péptidos de interés, para finalmente ser extraídos con flujo de agua y concentrados por secado rápido o bien encapsulados (S. Liu & Liu, 2014).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El departamento del Cauca para el año 2012 tuvo una producción piscícola de 783 toneladas, siendo la obtención de filete de pescado el objetivo de esta actividad, sin embargo entre un 50 y 70 % de la composición total del pescado corresponden a los mal llamados desechos, dentro de los que se encuentran: vísceras, piel, huesos y escamas (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005), que en la mayoría de las piscifactorías caucanas no se han dispuesto de manera adecuada, generando una alta contaminación en los cuerpos de agua y medio ambiente en general. Durante los últimos años se han buscado alternativas para el aprovechamiento de estos residuos, siendo utilizados como materia prima para la obtención de abono orgánico y ensilado (Goddard & Perret, 2005). Esta última tecnología se ha reportado como una alternativa viable, debido a que el proceso permite una mejor disposición de nutrientes como proteína, ácidos grasos insaturados, vitaminas, polisacáridos, fibra y minerales, los cuales pueden incorporarse en dietas para animales, mejorando parámetros de digestibilidad y absorción (Goosen, de Wet, Görgens, *et al.*, 2014). En la última década diferentes investigaciones a nivel mundial se basan en el aprovechamiento de subproductos no solamente del área piscícola sino de un sin número de cadenas productivas, siendo la búsqueda y obtención de compuestos bioactivos una de las áreas con mayor auge en la actualidad a nivel mundial o en países en desarrollo, obteniendo como resultado un valor agregado de alto impacto científico y comercial a lo que antes se desechaba (Chen, Yang, Sun, Niu, & Liu, 2012; Galla *et al.*, 2012; Goosen, de Wet, & Görgens, 2014; Goosen, de Wet, Görgens, *et al.*, 2014).

La proteína de origen piscícola presenta un valor nutricional, funcional y metabólico importante para la producción de componentes activos (Goosen, de Wet, & Görgens, 2014), en Colombia son pocos los estudios que reportan la obtención de compuestos bioactivos, específicamente péptidos bioactivos a partir de vísceras de pescado, lo que conlleva a un uso común, que no explota al máximo el potencial bioquímico de la proteína de pescado (Martínez-Alvarez *et al.*, 2015), en este sentido se deben explorar procesos que permitan la obtención de péptidos activos a partir de proteína presente en subproductos piscícolas. La metodología reportada para la obtención de péptidos activos a partir de fuentes proteicas de origen animal y vegetal es la hidrólisis enzimática (Ferraro *et al.*, 2013), proceso que requiere el control de parámetros como temperatura, tiempo de reacción, concentración de enzima, pH del medio entre otros, que al no ser controlados pueden generar

compuestos no deseados o bien degradación proteica, lo que llevaría a una pérdida total de la materia por descomposición (Halldorsdottir *et al.*, 2014).

Este trabajo se desarrolló en el marco de proyecto “Alternativas para el aprovechamiento de subproductos de la agroindustria piscícola-ALTPEZ-ID3883”. El cual ha generado un importante impacto en el área piscícola a nivel departamental y nacional. Obteniendo nuevos productos a partir de los subproductos generados de la producción de trucha en el municipio de Silvia-Cauca, dentro de estas investigaciones se llevó a cabo la obtención de péptidos activos los cuales juegan un papel importante en la regulación metabólica y la modulación de los seres vivos (Šližytė *et al.*, 2009). Los péptidos activos además de actuar como fuente de energía y nitrógeno tienen funciones fisiológicas y actividad demostrada como antihipertensivos, antioxidantes, antimicrobianos, anticoagulantes, antidiabéticos y anticáncer, (Mulero Cánovas, Zafrilla Rentero, Martínez-Cachá Martínez, Leal Hernández, & Abellán Alemán, 2011). Este estudio permitió estudiar a nivel de laboratorio el uso de proteína presente en vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), como fuente de compuestos activos, lo que ha permitido generar procesos y productos con valor agregado, los péptidos activos obtenidos de esta investigación pueden ser usados como ingredientes funcionales en alimentación animal, o productos nutricionales para mejorar la salud y prevenir algunas enfermedades (Harnedy & FitzGerald, 2012).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Evaluar las mejores condiciones de hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) para la obtención de péptidos activos.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Modelar la reacción de hidrólisis enzimática de proteínas presentes en subproductos piscícolas por método de superficie de respuesta.
- Estudiar la capacidad antioxidante de los péptidos obtenidos mediante hidrólisis enzimática, por medio de los métodos ABTS Y DPPH.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana de los péptidos obtenidos mediante hidrólisis enzimática.
- Determinar los pesos moleculares de los péptidos por medio de electroforesis SDS-PAGE y cromatografía líquida acoplada a masas.

## 4. METODOLOGÍA

La hidrólisis enzimática de subproductos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) usando como enzima protamex<sup>®</sup>, permitió la obtención de péptidos activos con capacidad antioxidante y antimicrobiana, generando productos con valor agregado al material que en la actualidad provoca problemas de contaminación en las algunas zonas de producción de truchas arcoíris en el departamento del Cauca.

### 4.1. LOCALIZACIÓN

El desarrollo metodológico se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de biotecnología de la Universidad del Cauca, facultad de ciencias agrarias, vereda las Guacas, municipio de Popayán, Cauca. Ubicada a una altitud de 1.850 msnm y a una temperatura promedio de 20 °C.

### 4.2. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE VÍSCERAS DE PESCADO

Los subproductos de la trucha arcoíris fueron obtenidos en el municipio de Silvia, de piscifactorías de la 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 2.527 m sobre el nivel del mar, y con una temperatura media de 15°C. Para ello se tomaron muestras al azar de estanques que contenían un promedio de 1.400 animales, los cuales se encontraban en fase de engorde y tienen un promedio de peso de 400 g. La recolección de subproductos se llevó a cabo en tarros tapa azul, con capacidad para 50 Kg, previamente desinfectados y refrigerados con hielo, las muestras se llevaron a los recipientes una vez realizado el proceso de evisceración, de manera inmediata fueron transportadas al laboratorio de biotecnología de la Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agrarias, Vereda las Guacas, municipio de Popayán, estas instalaciones están ubicadas a una altitud de 1850 msnm y una temperatura promedio de 20 °C. Para determinar la cantidad de muestra representativa o el “n” muestral, se aplicó la Ecuación 1.

$$\text{Ecuación 1. } n = \frac{N * Z^2}{(N-1) * e^2 + Z^2}$$

Donde:

n: tamaño de la muestra

N: tamaño del universo

Z: desviación del valor medio, Z=1,96 para un nivel de confianza 95%

E: margen de error máximo (p.e. 5%)

### 4.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS

Las vísceras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) se sometieron a un tratamiento de limpieza, debido a que estos animales generalmente ingieren elementos extraños como troncos y piedras. Para ello se efectuó una incisión en los estómagos y se lavó su interior con agua destilada en proporción 1:4, se descartó con una espátula el alimento que no había sido digerido y materiales como piedras y desechos vegetales, entre otros (Silva *et al.*, 2014; Kechaou *et al.*, 2009). Además de este procedimiento también se retiraron las branquias de los animales mediante un corte manual, finalmente el material fue homogenizado por medio de licuado hasta obtener una pasta semisólida (Slizyté *et al.*, 2005), los subproductos se caracterizaron bajo metodologías de análisis proximal AOAC (2005), con algunas modificaciones (Lee, 1995). La humedad se realizó de acuerdo al protocolo (AOAC. 934.01., 2005), para ello se pesaron en caja de Petri aproximadamente 1g de muestra por medio de una balanza analítica (Kern ALJ, KERN & Sohn GmbH, Balingen Alemania), posterior a esto se llevó a secado en horno de convección forzada Binder (Binder FD 115L, Tuttlingen, Alemania) a una temperatura de 105 °C por un tiempo de 4 horas, una vez transcurrido este tiempo se pesó la caja de Petri con el material seco y se colocó a horno nuevamente por un tiempo de 1 hora, este procedimiento se repitió hasta peso constante, el porcentaje de humedad se calculó de acuerdo a la ecuación:

$$\text{Ecuación 2. \% Humedad} = \frac{\text{Muestra}_{\text{humedad}} - \text{Muestra}_{\text{seca}}}{\text{Muestra}_{\text{humeda}}} \times 100$$

El contenido de proteína se determinó siguiendo la metodología (AOAC 968.06, 2005), se pesaron en balanza analítica 0,5 g de muestra seca en papel libre de nitrógeno, más 1 g de catalizador kjeldahl, esta mezcla se llevó a digestión agregando 10 mL de ácido sulfúrico (65 %, Merck) en un bloque de calentamiento Raypa (Raypa R. Espinar, S.L, Barcelona, España), las muestras se digestaron hasta estar completamente claras y traslucidas, una vez alcanzada la temperatura ambiente después de la digestión, se agregaron 50 mL de agua destilada, se

neutralizaron con 80 mL de hidróxido de sodio al 30% y se destilaron en un equipo de destilación Raypa Raypa (Raypa R. Espinar, S.L, Barcelona, España), el destilado se recogió en 100 mL de ácido bórico al 3 %, teniendo como indicador tashiro, finalmente se tituló con HCL 0,1 N, el cálculo del contenido de proteína se realizó multiplicado el porcentaje de nitrógeno obtenido de la Ecuación 3, por el factor para alimentos cárnicos 6,25.

$$\text{Ecuación 3. \% de Nitrogeno} = \frac{(\text{mL HCL} - \text{mL HCL}_0) \times \text{N HCL} \times 14}{(\text{peso de la muestra} \times \% \text{ de MS analitica})} \times 100$$

El extracto graso se determinó empleando la metodología (AOAC 991.36, 2005), para ello se pesó aproximadamente 1 g de muestra en cartuchos de extracción microsoxhlet, el cual se llevó a un sistema de extracción SOXHTEXT Raypa (Raypa R. Espinar, S.L, Barcelona, España), se realizó reflujo por un tiempo de 4 horas usando como solvente de éter etílico (98 %, Panreac). La cantidad de grasa fue determinada mediante la diferencia del peso del material desengrasado y sin desengrasar, de acuerdo a la Ecuación 4.

$$\text{Ecuación 4. \% Grasa} = \frac{\text{Crisol} + \text{grasa} - \text{Crisol}_{\text{limpio}}}{\text{Wmuestra}} \times 100$$

Para la determinación de fibra bruta se usó el protocolo (AOAC 962.09, 2005), para ello se transfirió cuantitativamente a un crisol para fibra 1 g de materia desengrasada, al sistema para la cuantificación de fibra FIBERTEST Raypa (Raypa R. Espinar, S.L, Barcelona, España), al cual se le adicionó 100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.255 N, previamente calentado hasta ebullición, se dejó en reflujo por exactamente 30 minutos, la solución ácida fue retirada y el material se lavó con agua destilada caliente hasta obtener un residuo neutro, para la digestión básica se adicionaron 100 mL de NaOH 0.313 N previamente calentado hasta ebullición, la mezcla se dejó en reflujo por exactamente 30 minutos, una vez transcurrido este tiempo, el material se lavó con agua destilada hasta obtener un pH neutro, se realizaron lavados con etanol para finalmente llevar el crisol a secado y posterior calcinación en mufla por espacio de 20 minutos a 550 °C, el porcentaje de fibra se determinó por medio de la Ecuación 5.

$$\text{Ecuación 5. \% Fibra cruda} = \frac{[(\text{Peso fibra} + \text{peso crisol}) - (\text{peso crisol} + \text{cenizas})]}{(\text{peso de la muestra} \times \% \text{ de MS analitica})} \times 100$$

La determinación de cenizas se realizó bajo protocolo (AOAC 942.05, 2005), las muestras desengrasadas se secaron en estufa a 100 °C por 30 minutos, se pesó un

1 g de muestras seca en crisol con tapa, posterior a esto se llevó a temperatura de 425 °C en mufla, con el fin de lograr la incineración y liberación de compuestos gaseosos sin formación de llamas, la temperatura se aumentó gradualmente hasta llegar a un máximo de 550 °C y se mantuvo en este nivel durante 2 horas aproximadamente, finalmente los crisoles fueron dispuestos en desecadores hasta alcanzar temperatura ambiente, luego se pesaron para la determinación del contenido de cenizas en la muestra de acuerdo a la Ecuación 6. la determinación de carbohidratos se tomó como la diferencia entre el 100 % menos el contenido porcentual del resto de componentes.

$$\text{Ecuación 6. \% de cenizas} = \frac{\text{Peso crisol+ceniza}-\text{peso del crisol vacío}}{\text{Peso de la muestra seca}} \times 100$$

#### 4.4. INACTIVACIÓN DE ENZIMAS ENDÓGENAS DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS POR TRATAMIENTO TÉRMICO

Se llevó a cabo la inactivación de enzimas endógenas y de microorganismos presentes en vísceras trucha por medio tratamiento térmico, se evaluaron tres diferentes temperaturas de inactivación 65 °C, 80 °C y 94 °C (Shikha *et al.*, 2016), a diferentes tiempos  $t_0=15$  y  $t_1=30$  minutos de acuerdo al Cuadro 3 (Slizyté *et al.*, 2005; Guerard *et al.*, 2002). El montaje experimental se efectuó en un baño termostático (Cole-Parmer, Vernon Hills, USA), para ello el baño se precalentó y se dispusieron los subproductos dentro del equipo, una vez alcanzada la temperatura de inactivación se contó el tiempo para cada unidad experimental. El factor de respuesta para la inactivación de enzimas es la actividad proteolítica residual, analizada por medio del método TNBS, para la inactivación de carga microbiana se realizaron análisis microbiológicos antes y después de cada tratamiento térmico.

**Cuadro 3.** Valores para la inactivación térmica de enzimas y microorganismo.

No	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	65	15
2	65	30
3	80	15
4	80	30
5	94	15
6	94	30
<b>Blanco</b>	0	0

Fuente: Gaviria (2017)



#### 4.4.1. Determinación de la inactivación de carga enzimática en vísceras de trucha

Para determinar la actividad enzimática se llevó a cabo el establecimiento del método TNBS, este consiste en la reacción del ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico con los grupos  $\alpha$ -amino primarios (Adler-Nissen & Olsen, 1982; Eklund, 1976). Se usó como estándar de aminoácidos  $\alpha$ -leucina, la cual reacciona con el ácido trinitrobenceno sulfónico, para formar un compuesto cromóforo que tiene un punto máximo de absorbancia a 420 nm, la curva de calibración se preparó de la siguiente manera:

Se tomó 0,5 g de  $\alpha$ -Leucina (99, 99 % Sigma Aldrich,) y se secaron a 100 °C por dos horas, de este patrón seco se pesaron 0.0659 g, y se diluyeron con agua destilada hasta un volumen de 50 mL en balones de calibración, con lo que se obtuvo una concentración de 10 mM (solución Stock), se realizaron diluciones para preparar la curva de calibración de acuerdo al Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Curva de calibración-método TNBS.

Cantidad de solución stock	Volumen Final	Concentración
1 mL	Aforar a 10 mL	0,5 mM
2 mL	Aforar a 10 mL	2,0 mM/
4 mL	Aforar a 10 mL	4,0 mM
6 mL	Aforar a 10 mL	6,0 mM
8 mL	Aforar a 10 mL	8,0 mM
9 mL	Aforar a 10 mL	9,0 mM

Fuente: Gaviria (2017)

Se tomaron 128  $\mu$ L de cada patrón y se adicionó 2 mL solución buffer fosfato pH 8,2, más 1 mL de reactivo de TNBS AL 0,01 % (5 % Sigma Aldrich), se agitó vigorosamente en vórtex por 15 segundos y se colocó en baño de agua a una temperatura de 50 °C por 30 minutos, luego se adicionó 2 mL de solución de sulfito de sodio 0,1 M y se dejó 15 minutos en reposo, finalmente se realizó la lectura en el espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu 1800, Shimadzu Corp., Kyoto, Japón) a una longitud de 420 nm, se determinó la ecuación de la curva de calibración por regresión lineal, el proceso se realizó bajo oscuridad, sin incidencia directa de la luz sobre la solución.

Para el seguimiento de la actividad enzimática, se tomaron muestra compuestas del material inactivado para unidad experimental (ver Cuadro 3), a intervalos de tiempo

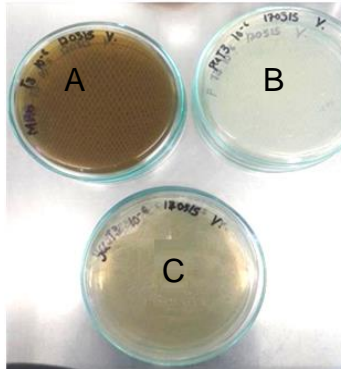
de 0, 30 y 60 minutos, de estas muestras se pesaron 4 g y se adicionó 6 mL de solución buffer fosfato pH 7,0 (Relación 2:3), se realizó vórtex por 10 segundos, se llevó a centrifugación a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C (Hermle Z326 K, Alemania), se realizó la extracción del sobrenadante y se filtró a vacío con papel whatman N°1. Se llevaron a cabo diluciones de 250 µL en 10 mL de agua destilada, se tomaron 128 µL de la dilución en tubo de ensayo tapa rosca y se adicionaron 2 mL solución buffer pH 8,2, más 1 mL de reactivo de TNBS AL 0,01 %, se agitó vigorosamente con vórtex por 15 segundo y colocó a baño de agua a una temperatura de 50° C por 30 minutos, luego se adicionó 2 mL de solución de sulfito de sodio 0,1 M y dejó 15 minutos en reposo, finalmente se realizó la lectura en el espectrofotómetro UV-Visible a una longitud de 420 nm. La determinación de  $\alpha$ -aminoácidos en la muestra se realizó interpolando los valores de absorbancia obtenidos de la muestra en la ecuación de la curva de calibración, determinando mg de leucina por gramos de muestra, la actividad enzimática se reportó como la velocidad de liberación de aminoácido dada por las milimoles de leucina por minuto (mmolLeu/min), como blanco positivo se analizó una muestra sin tratamiento térmico.

#### **4.4.2. Determinación de la Inactivación de carga microbiológica en vísceras de trucha**

El recuento de aerobios mesófilos (NTC 4519, 2009) se realizó en Agar plate count (APC) por siembra en estrías incubando las muestras a 35 °C por 48 h. El recuento de mohos y levaduras (NTC 4132, 2008) se realizó por siembra en Potato Dextrosa Agar (PDA) a 25 °C durante un periodo de 3 a 5 días. Para realizar el conteo de coliformes totales, se utilizó el método del número más probable (NMP) (NTC 4516, 2009) por siembra en tubos de fermentación en caldo verde bilis brillante, la temperatura de incubación fue de 35 °C por 24 horas, para lo cual se realizaron diluciones seriadas de la muestra de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  en 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 los cuales se muestran en la Figura 4.

**Figura 4.** Medios de cultivo selectivos para el análisis microbiológico.



Fuente: Gaviria (2017). A: MRS, B: PCA Y C YGC

El volumen de muestra inoculado fue de 0,1 mL, el cual se dispersó mediante perlas de vidrio como se muestra en la Figura 5, cada una de las diluciones se inoculó por duplicado.

**Figura 5.** Inoculación de la muestra en los medios de cultivo selectivos.



Fuente: Gaviria (2017)

El recuento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL) se realizó teniendo en cuenta la Norma Técnica Colombiana 4458 (NTC 4458, 2007) basada en la Ecuación 7.

$$\text{Ecuación 7. } UFC/mL = \frac{\sum C}{V(n1+0.1n2)d}$$

$\sum C$ : 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.

#### 4.5. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS

Teniendo en cuenta los reportes y fichas técnicas de cada enzima se decidió usar Protamex® como la enzima para llevar a cabo el proceso de hidrólisis, en comparación con muchas otras endoproteasas, esta enzima no produce hidrolizados de proteína con sabores amargos incluso a bajos grados de hidrólisis. Una vez adquirida la enzima, se evaluó su actividad a las condiciones sugeridas por el fabricante, para ello se usó proteína de soya, la cual usando tiene una alta digestibilidad y un importante balance de todos los aminoácidos, las condiciones de análisis se muestran en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Condiciones de actividad enzimática de Protamex®.

Parámetro	Valor
pH	7,0
Temperatura	40 °C
Tiempo	0, 10, 20, 45, 60 min

Fuente: Gaviria (2017)

La reacción de hidrólisis se llevó cabo en un agitador Thermo con control de temperatura y agitación (Thermo MaxQ 4450, Alemania), para ello se prepararon soluciones al 5 % de proteína de soya en agua destilada y se ajustó el pH a un valor de 7,0 con hidróxido de sodio 0,1 N, luego se calentó la solución hasta 40 °C y se adicione la enzima en una relación del 1 % respecto al sustrato, se tomaron muestras a tiempos de 0, 10, 20, 45, 60 minutos (Ennaas *et al.*, 2015b), la actividad enzimática se determinó por el método TNBS descrito en el numeral 4.4.1.

##### 4.5.1. Obtención de aislado proteico

Las muestras inactivadas térmicamente se sometieron al proceso de obtención de aislado proteico, esto con el fin de garantizar un alto grado de hidrólisis, así como eliminar interferencias que afectan este tipo de reacciones enzimáticas. Los subproductos se sometieron a diferentes etapas para concentrar la proteína, el producto final obtenido se le denominó aislado proteico, las etapas para la obtención se describen a continuación.

Las vísceras de trucha inactivadas térmicamente se homogenizaron por medio de un proceso mecánico en licuadora Oster convencional previamente desinfectada, esta operación se llevó a cabo hasta obtener una pasta semisólida, la cual se colocó en tubos de centrifuga con capacidad de 100 g, los cuales se centrifugaron a 12.000

rpm a 10 °C por 12 minutos en centrifuga (Hermle Z326K, Alemania), la fase grasa situada en parte superior se retiró por decantación, el material restante se llevó a secado en Horno de convección forzada marca Binder (Binder FD 115L, Tuttlingen, Alemania), las condiciones de secado fueron: 65 °C por 12 horas, eliminada gran parte de la humedad se realizó un segundo paso de desengrasado por medio de Soxhlet, por un tiempo de 4 horas, usando éter de petróleo como solvente, los cartuchos se secaron a: 65 °C por 12 horas, el material obtenido se molió hasta obtener partículas finas y por último y el aislado de proteína se pasó por tamiz metálico malla número 30 serie Tayler, el material obtenido y el residual el proceso de tamizaje se caracterizó mediante análisis proximal, de acuerdo a protocolos AOAC, descritos en el numeral 4.3, además se realizó un perfil de aminoácidos por cromatografía líquida por medio de un servicio externo en laboratorio especializado Quantar S.A.

#### 4.5.2. Diseño experimental para grado de hidrólisis

La modelación de la reacción de hidrólisis enzimática se llevó a cabo por medio de superficie de respuesta (RSM), el diseño plateado es un central compuesto 2<sup>3</sup>+puntos estrella, ortogonal y rotatable, generado por el software Statgraphics® (STSC Inc. Rockville, Md, USA, versión plus 5.1), los factores usados fueron: temperatura, tiempo y concentración de la enzima, el diseño se compone de dos niveles alto y bajo, los cuales se determinaron por resultados preliminares y bibliografía (Ennaas et al., 2015b; Je et al., 2015; Ko *et al.*, 2013; Y. Liu *et al.*, 2014), el grado de hidrólisis (GH %) se empleó como la variable respuesta, determinada por el método TNBS, el análisis de los resultados se realizó en el paquete estadístico Statgraphics® Centurión, versión 16.1.03. En el Cuadro 6 se describen los factores del diseño experimental y sus respectivos niveles, en los Cuadro 7 y Cuadro 8, se muestra el resumen del diseño experimental, la cantidad de unidades experimentales y a que parte del diseño corresponden.

**Cuadro 6.** Factores y niveles diseño experimental GH.

Factor	Bajo	Alto	Unidades
Tiempo	12	36	h
Concentración de enzima [E/S]	3	8	% (p/p)
Temperatura	40	60	°C

Fuente: Gaviria (2017)

**Cuadro 7.** Resumen diseño experimental grado hidrólisis

Componente del diseño	Unidades experimentales
Central compuesto <sup>2</sup> <sup>3</sup>	8
Puntos Estrella	6
Replicas punto central	9

Fuente: Gaviria (2017)

**Cuadro 8.** Unidades experimentales diseño GH.

	Tiempo (h)	E/S (% p/p)	Temperatura (°C)
<b>Central compuesto</b>	12,0	3,0	40,0
	36,0	8,0	60,0
	12,0	8,0	60,0
	36,0	3,0	60,0
	36,0	8,0	40,0
	36,0	3,0	40,0
	12,0	8,0	40,0
	12,0	3,0	60,0
<b>Puntos estrella</b>	3,8	5,5	50,0
	44,2	5,5	50,0
	24,0	5,5	33,2
	24,0	1,3	50,0
	24,0	5,5	66,8
	24,0	9,7	50,0
<b>Punto central</b>	24,0	5,5	50,0

Fuente: Gaviria (2017)

Para la determinación del GH se determinaron los aminoácidos libres en la en cada unidad experimental de acuerdo a la metodología planteada en numeral 4.4.1 mediante el método TNBS, además de ello se cuantificaron los aminoácidos totales que componen la proteína del aislado proteico, para ello se pesaron 0,5 g de muestra en un tubo de ensayo con tapa rosca limpio y seco, luego se adicionaron 4,5 mL de ácido clorhídrico 6 N, los tubos se colocaron en un baño de arena, y se llevaron a 100 °C por 24 horas en horno. Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis, los tubos se llevaron a temperatura ambiente y se adicionó por las paredes lentamente 4,5 mL de hidróxido de sodio 6 N, finalmente las muestras hidrolizadas se filtraron por papel whatman No1 y se cuantificaron los aminoácidos libres por medio de la curva de calibración del método TNBS. El grado de hidrólisis se calculó de acuerdo a la Ecuación 8.

$$\text{Ecuación 8. } GH = \frac{P1-P0}{PT-P0} * 100$$

Dónde:

P1: concentración de Aminoácidos liberados expresados como mg Leu/g de proteína en la muestra.

PT: concentración de Aminoácidos totales expresados como mg Leu/g de proteína en la muestra.

P0. concentración de Aminoácidos iniciales expresados como mg Leu/g de proteína en la muestra.

#### **4.6. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CA)**

La capacidad antioxidante en los péptidos obtenidos por la hidrólisis enzimática de proteínas de vísceras de trucha, se evaluó mediante los métodos ABTS y DPPH. Para ello se analizaron los hidrolizados que se obtuvieron de la reacción de hidrólisis llevada a cabo bajos los parámetros de temperatura, tiempo y pH óptimos encontrados en el diseño experimental del numeral 4.5.2, y 4.6.3.

##### **4.6.1. Método ABTS**

La actividad de captación de radicales ABTS por parte de los hidrolizados se evaluó de acuerdo con la metodología descrita por Borawska *et al.*, (2016) (Borawska, Darewicz, Vegarud, & Minkiewicz, 2016), para ello se disolvió 134,4 mg de ABTS, en 35 mL de agua desionizada para obtener una solución de concentración 7 mM, luego se prepararon 10 mL de solución de persulfato de potasio 2,45 mM, para la obtención del radical se mezclaron las soluciones de persulfato y ABTS en un frasco ámbar y se mantuvieron durante 16 horas en oscuridad.

Para realizar la curva de calibración, se realizó un ajuste de la absorbancia por medio de la dilución del radical ABTS con agua desionizada hasta una absorbancia cercana a 0,7 en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 734 nm, se preparó una solución Stock de Trolox, disolviendo 25 mg en 50 mL de agua destilada, obteniendo una concentración de 2000 µM, a partir de la cual se prepararon por dilución cinco estándares de 10 mL a concentración de 300, 200, 150, 100 y 50 µM.

Para la reacción de absorción del radical ABTS por cada estándar de trolox se tomaron 3,0 mL de solución de radical ABTS más 100 µL de cada patrón y se dejaron reaccionar durante seis minutos, transcurrido el tiempo se realizó la lectura de la absorbancia en espectrofotómetro Shimadzu a una longitud de onda de 734

nm. La actividad antioxidante se expresó como mM de trolox a partir de la curva de calibración y porcentaje de inhibición, determinado por medio de la Ecuación 9.

$$\text{Ecuación 9. } \% \text{ inhibición} = \%I = \frac{A-A_1}{A} \times 100$$

Donde

A: es la absorbancia del blanco

A<sub>1</sub> es la absorbancia de la muestra.

Para la determinación de la actividad antioxidante de las muestras los hidrolizados fueron centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante se pasó por filtros de jeringa con tamaño de poro de 0.45 µm, del cual se tomaron 100 µL de y se mezclaron con 3,0 mL de solución de radical ABTS, la mezcla se dejó reaccionar por seis minutos y se determinó su absorbancia de manera similar como se realizó con los estándares. La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición, lo cual corresponde a la cantidad de radical ABTS neutralizado por el extracto de acuerdo a la Ecuación 9, la capacidad antioxidante expresada como equivalentes Trolox (TEAC µmol/g), se obtiene al interpolar la absorbancia de la muestra en la curva de calibración.

#### 4.6.2. Método DPPH

La actividad por el método DPPH, se midió de acuerdo a la metodología descrita por Zhang *et al.*, (2012), para ello se prepararon 100 mL del radical disolviendo 1,0 mg de DPPH en metanol anhidro, luego se dispuso esta solución en frasco ámbar, obtenido una solución de concentración 10 mg/L. El reactivo se ajustó por dilución con metanol a una absorbancia cercana a 0,7 en una longitud de onda de 517 nm.

Para la curva de calibración se prepararon 50 mL de un stock de Trolox (2000 µM), a partir de esta solución se prepararon cinco estándares de 10 mL de concentración finales de 300, 200, 150, 100 y 50 mM, una vez obtenido los estándares se tomaron 4,0 mL de solución de DPPH y 200 de cada uno de los patrones y se dejaron reaccionar por 30 minutos en la oscuridad, finalmente se determinó la absorbancia en espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu 1800, Shimadzu Corp., Kyoto, Japón) a una longitud de onda de 517 nm. La actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición, lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración, de acuerdo a la Ecuación 9.



Para la determinación de la actividad antioxidante de las muestras por el método DPPH, los hidrolizados fueron centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante se pasó por filtros de jeringa con tamaño de poro de 0,45 µm, del cual se tomaron 200 µL de cada hidrolizado y se mezclan con 4,0 mL de solución de radical DPPH, Cada muestra se dejó reaccionar por treinta minutos y se determinó su absorbancia de manera similar que los estándares, la actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición, lo cual corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el hidrolizado, de acuerdo a la Ecuación 9, la capacidad antioxidante expresada como equivalentes Trolox (TEAC µmol/g).se obtiene al interpolar la absorbancia de la muestra en la curva de calibración.

#### 4.6.3. Diseño experimental actividad antioxidante

Una vez analizados los datos de la capacidad antioxidante encontrada en los hidrolizados de proteína de vísceras de trucha arcoíris, se hizo necesario llevar a cabo un nuevo diseño, el cual evalúa la reacción de hidrólisis a un tiempo y relación enzima sustrato menor que el diseño presentado en el numeral 4.5.12, pero bajo las condiciones óptimas de pH y temperatura. El diseño consistió en un factorial 2<sup>2</sup>+ Puntos estrella, la temperatura fue de 38,2 °C y un pH de 7,0, la capacidad antioxidante se tomó como respuesta, los factores y niveles se muestra en el Cuadro 9, el análisis de los resultados se realizó con el paquete estadístico Statgraphics® Centurión, versión 16.1.03, los Cuadro 10 y Cuadro 11 muestran el resumen del diseño y la distribución de las unidades experimentales.

**Cuadro 9.** Factores y niveles diseño experimental CA.

Factor	Bajo	Alto	Unidades
Tiempo	1	3	h
Concentración de enzima [E/S]	3	8	% (p/p)

Fuente: Gaviria (2017)

**Cuadro 10.** Resumen diseño experimental Actividad antioxidante.

Componente del diseño	Unidades experimentales
Factorial 2 <sup>2</sup>	4
Puntos Estrella	4
Replicas punto central	2

Fuente: Gaviria (2017)

**Cuadro 11.** Diseño experimental Actividad antioxidante

	Tiempo (h)	E/S (%p/p)
<b>Factorial</b>	1,00	3,00
	3,00	8,00
	1,00	8,00
	3,00	3,00
<b>Puntos estrella</b>	2,00	9,04
	2,00	1,96
	0,59	5,50
	3,41	5,50
<b>Punto central</b>	2,00	5,50

Fuente: Gaviria (2017)

#### **4.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA (AAM)**

Para determinar la actividad antimicrobiana de los péptidos obtenidos de la hidrólisis enzimática de proteínas presentes en vísceras de trucha se ejecutaron pruebas de antagonismo de los hidrolizados frente a dos cepas patógenas que afectan, generan enfermedades y problemas en la producción de tilapia roja, como los son el *Streptococcus agalactae* (ATCC 51487), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 700183) adquiridas por el laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Cauca, para ello se empleó la técnica de difusión por pozo (Ennaas et al., 2015b; Rajanbabu & Chen, 2011; Robert et al., 2015). En cajas de Petri se realizó una siembra masiva de *Aeromonas hydrophila* en agar nutriente y de *Streptococcus agalactiae* en agar BHI. Se tomaron 50 µL de cada hidrolizado y se inocularán en los diferentes pozos presentes en los medios de cultivo, finalmente las cajas se colocaron en incubación por 24 horas a 35 °C; como control positivo se emplearon sensidiscos de antibióticos amoxicilina, cloranfenicol y gentamicina, como control negativo se inocularon pozos con 50 µL de agua destilada.

##### **4.7.1. Preparación y activación de cepas patógenas**

Se realizó la preparación de los caldos de cultivo donde se activarán las cepas patógenas, para ello se pesó 2,7 g de Caldo de soya tréptico (TSB) y se diluyó en 90 mL de agua destilada, para el caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI) se pesó 1,48 g de BHI y luego se diluyó en 40 mL de agua destilada, los caldos se distribuyeron en tubos taparrosca adicionando 9 mL en cada uno, todo el material

se autoclavo para eliminar cualquier tipo de contaminación, en la Figura 6, se muestran los reactivos usados para esta preparación.

**Figura 6.** Caldos y medios de cultivo.



Fuente: Gaviria (2017)

La preparación de agares para la medida de la actividad se realizó de la siguiente manera, se pesaron 25,6 g de Tripticasa soya (TSA) y se diluyeron en 640 mL, para el agar de infusión de cerebro y corazón (BHI) se pesaron 16,64 g de BHI y se diluyeron en 320 mL, todos los medios se diluyeron por medio de agitación y calentamiento hasta ebullición.

**Tabla 3.** Caldo de cultivo y agares usados para cuatro bacterias.

Bacteria	Caldo de cultivo para activación	Medio de cultivo en agar
<i>Streptococcus agalactiae</i>	BHI**	BHI
<i>Aeromonas hydrophila</i>	TSB*	TSA

\* TSB: Caldo tripton de soja, \*\* BHI: infusión cerebro-corazón

La activación de las bacterias se realizó en una cabina de flujo laminar desinfectada con alcohol, se inocularon las bacterias con un aza flameada en los caldos de cultivo especificados en la Tabla 3, luego se llevaron a incubación a 37 °C durante 24 horas, pasado este tiempo se hizo dilución de 1 mL en 9 mL en caldo autoclavado y se dejaron en incubación a 37 °C.

#### 4.7.2. Medida de actividad antimicrobiana

Una vez activadas las dos cepas patógenas estas se llevaron a siembra en agares, para ello en cabina de flujo se dispusieron 20 mL de cada agar en cajas de Petri previamente limpias, secas y autoclavadas, se inocularon la *Aeromonas hydrophila*

en agar nutriente y de *Streptococcus agalactiae* en agar BHI. La siembra masiva de las bacterias se realizó impregnando un hisopo con bacteria presente en los caldos de cultivo, luego se realizaron pases del hisopo por todo el agar, tratando de cubrir toda la superficie, estas operaciones se llevaron en cabina de flujo laminar. Una vez sembrada la bacteria se formaron cuatro pozos por cada caja de Petri, para ello se usó la parte ancha de puntas de micropipeta (Chia *et al.*, 2010). Para el tratamiento de las muestras se tomaron 10 mL de cada hidrolizado y se llevaron a centrifugación a 12.000 rpm por 10 minutos a una temperatura de 4°C, el sobrenadante obtenido se pasó por filtros de jeringa con un tamaño de poro de 0,45 µm, en cada pozo se adicionaron 50 µL de hidrolizado, se evaluaron los hidrolizados obtenidos bajo las condiciones óptimas de reacción, resultado del diseño experimental del numeral 4.5.2 y las unidades experimentales del diseño planteado en el numeral 4.6.3, como blancos se usó Agua y buffer fosfato, soluciones en los que se encuentran los extractos, el control positivo fueron los Antibióticos: OT: Oxitetraciclina, C: Cloranfenicol, AMP: Ampicilina. Después de 24 horas de incubación se midió el halo de inhibición con un pie de rey, los resultados se expresan como el diámetro del halo de inhibición en mm.

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos se llevó a cabo la medida de la actividad antimicrobiana por medio de inoculación en caldo, midiendo la turbidez de la muestra a 600 nm, para ello se preparó caldo de cultivo TSB, el cual fue inoculado con la bacteria *Aeromonas hydrophila*, luego se agregaron 50 µL de cada hidrolizado, se determinó la absorbancia a tiempos de 0, 2 y 4 horas, los hidrolizados evaluados fueron los obtenidos del diseño experimental planteado en el 4.6.3.

#### **4.8. DETERMINACIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES DE PÉPTIDOS POR ELECTROFORESIS SDS-PAGE**

Los dos hidrolizados que presentaron capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana se caracterizaron por electroforesis, con el fin de caracterizar las masas moleculares de los péptidos que los componen, para ello se usó la metodología descrita por Ketnawa *et al.*, (2014) con algunas modificaciones (Ketnawa *et al.*, 2014; Szabo & Janaky, 2015). Para la polimerización del gel de acrilamida, se mezclaron los reactivos del gel de corrida (10 %) y de apilamiento (5 %), en dos tubos diferentes, en un Beaker se adicionó 4,8 mL agua, se mezclaron con 2,5 mL del buffer Tris pH 8,8 (1.5 M), luego se adicionó 2,5 mL de acrilamida al 40 % y 0,1 mL de SDS y el persulfato de amonio al 10 %, finalmente se sirvió en el

molde de electroforesis y se adicionó 40  $\mu$ L de TEMED, una vez terminado este proceso al gel de corrida se le adicionó una ligera capa de isopropanol para asegurar una superficie plana y evitar contacto con el oxígeno atmosférico el cual limita la polimerización, luego de polimerizado el gel de corrida se descartó el isopropanol y se limpió con agua la interface, se adicionó TEMED al gel de apilamiento, se mezcló y sirvo hasta el tope, posterior a esto se insertó el peine para dar forma a los pozos donde se sirvieron los hidrolizados proteicos, para ello se tomaron 20  $\mu$ L de hidrolizado previamente centrifugado a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C, y pasados por filtro de jeringa de 13 mm y 0,22  $\mu$ m, los cuales se depositaron en el gel de acrilamida.

La cámara de electroforesis fue tapada y se aplicó un voltaje de 100 V hasta que las muestras llegaron al gel de corrida, en este punto se aplicó un voltaje de 200 V, una vez el frente de las muestras (línea azul) llego al final del gel, se detuvo el voltaje y se desmonto el gel de las placas de vidrio, luego se sumergieron en la solución de tinción de azul de commassie, y se colocaron a calentar en microondas por 30 segundos, el gel se dejó en tinción por 5 minutos con agitación constante, la solución de tinción se decantó y se realizaron lavados con agua, finalmente el gel se sumergió en solución de desteñido y se calentó en el microondas por 30 segundos, se dejó hasta que se perdió el color y se marcaron algunas bandas.

#### **4.9. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE PÉPTIDOS ACTIVOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A MASAS.**

Se determinaron los pesos moleculares de los péptidos activos obtenidos de hidrólisis enzimática de vísceras de trucha arcoíris por cromatografía líquida acoplada a un detector de masas, para eso se utilizó un UHPLC DIONEX ULTIMATE 3400 RSLC, equipado con una columna C18, como fases móviles se usó A: agua 0,1 % de ácido fórmico y B: Acetonitrilo 0,1 % ácido fórmico. El detector fue un Thermo scientific exactive plus (HCD) Orbitrap<sup>®</sup>, equipado con una fuente de ionización química por electro spray HESI y un analizador de masas Orbitrap<sup>®</sup>, el software para el manejo del equipo y el análisis de los datos fue Thermo Xcalibur versión 3.1.

#### 4.9.1. Parámetros de análisis para fuente de ionización HESI y detector Orbitrap®

Para el análisis de péptidos por UHPLC acoplado a un detector de masas Orbitrap, se determinaron las mejores condiciones para los parámetros de escaneo y fuente de ionización por electro spray HESI, para maximizar la señal de los analitos se usaron hidrolizados obtenidos en esta investigación, los valores de inicio se tomaron de acuerdo a lo reportado en bibliografía por autores como Olkowicz y Shao (Shao *et al.*, 2014); (Olkowicz *et al.*, 2015) los parámetros a evaluar se describen en la Tabla 4. Parámetros del detector de masas Orbitrap Exactive plus.

**Tabla 4.** Parámetros del detector de masas Orbitrap Exactive plus.

Parámetros de escaneo	Parámetros fuente HESI
Rango de scan	Flujo gas envolvente
Fragmentación	Gas auxiliar
Resolución	Voltage del spray
Polaridad	Temperatura capilar ITT°C
AGC Target	S-lens
Tiempo	Temperatura Gas Auxiliar °C

Fuente: Gaviria (2017)

Los valores descritos en la Tabla 4, se variaron en el tiempo con el fin de incrementar la señal (NL), además de mantener un valor por encima del 80 % en el % AGC Target, y una variación menor al 10 % en la corriente iónica total TIC.

#### 4.9.2. Condiciones cromatográficas

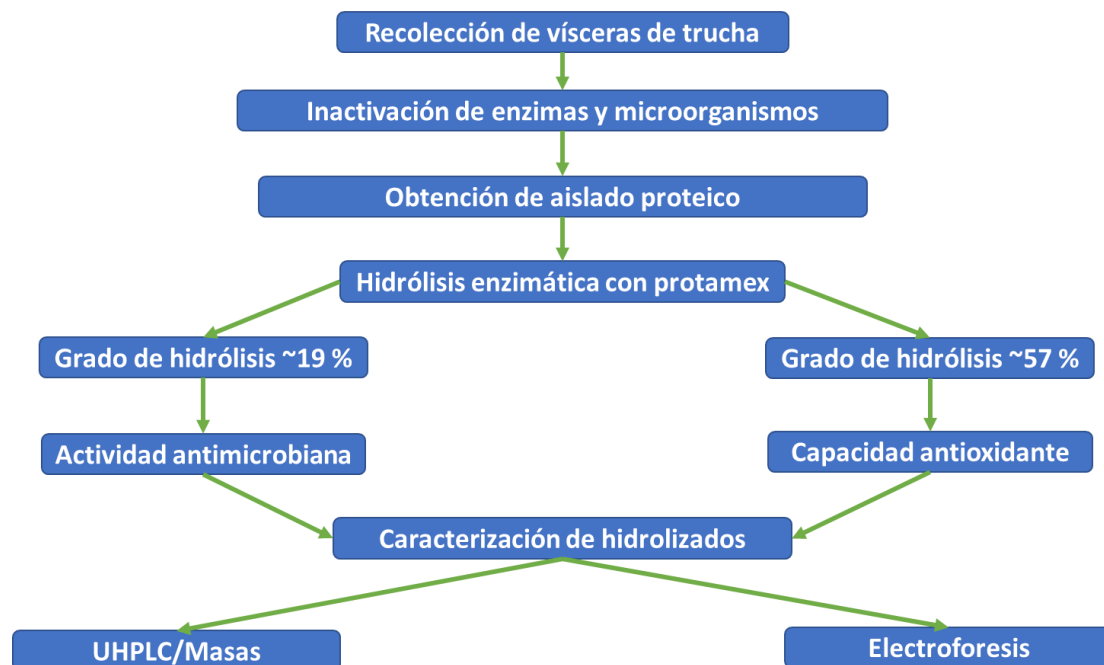
Las condiciones de fase móvil, gradiente, temperatura de columna y caudal se determinaron a partir de métodos reportados por Toopcham *et al.*, (2015) (S. Liu & Liu, 2014; Toopcham *et al.*, 2015), Los péptidos se separaron en Columna C18, referencia titan C18, 2,09 mm de diámetro y 10 cm de largo, con un tamaño de partícula de 1,9 µm. La fase móvil estaba compuesta por A agua con 0,1 % de ácido fórmico y B acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1 %, el gradiente se realizó de la siguiente manera 5 minutos para equilibrar la columna, luego un gradiente con una duración de 8 min de 20% a 100% (B), en un tiempo constante de 5 min y un retorno de 5 min, el flujo se mantuvo constante a 300 µL/min, el compartimiento de columna se mantuvo a una temperatura de 30 °C, se inyectaron 10 µL de muestra por medio del automuestreador.

#### 4.9.3. Pesos moleculares de péptidos activos en hidrolizados proteicos de subproductos de trucha

Una vez establecidas las mejores condiciones del detector Orbitrap® y del cromatógrafo líquido Dionex 3400, se procedió a determinar los pesos moleculares de los péptidos que componen el hidrolizados. En un vial nuevo limpio se pesaron aproximadamente 0,5 mg de hidrolizado, y se disolvieron en 5 mL de la solución Agua:Acetonitrilo en relación 80:20, con lo que se obtiene una concentración de 100 mg/L, luego se adicionó 1 mL de ácido tricloacético a una concentración de 20 %, la mezcla se llevó a centrifugar a 12.000 rpm a 4 °C por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 1 mL de solución de Agua:Acetonitrilo 80:20, a la muestra se le realizó agitación en vórtex hasta observar solubilidad total de la muestra, luego se realizaron diluciones seriadas hasta obtener una concentración de 100 µg/L, usando como solvente la solución Agua: Acetonitrilo en relación 80:20, teniendo en cuenta la concentración de la proteína en la muestra inicial, finalmente, las soluciones se pasaron por medio filtro de jeringa de 0,22 µm, y se depositaron en un vial nuevo para cromatografía.

En la Figura 7, se muestra el resumen en diagrama de la obtención de péptidos activos a partir de proteína de vísceras de trucha arcoíris.

**Figura 7.** Obtención de péptidos activos a partir de subproductos de trucha



Fuente: Gaviria (2017)

## 5. ANÁLISIS Y RESULTADOS

### 5.1. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE VÍSCERAS DE PESCADO

En la Figura 8 se observa la recolección y toma de muestras de vísceras de trucha arcoíris, las muestras presentaron un color rojo intenso característico de material fresco (Rajanbabu.y Chen. 2011).

**Figura 8.** Proceso de obtención de muestra de vísceras de trucha.



Fuente: Gaviria (2017)

La población por estanque fue de aproximadamente 1.400 animales, en el Cuadro 12 se muestra los parámetros de obtención de muestras de acuerdo a la Ecuación 1, la cantidad de animales representativos o “n” muestral se describen en el Cuadro 13.

**Cuadro 12.** Parámetros para muestreo de vísceras de trucha.

Parámetro	Valor
animales	1.500 unidades
animales/m <sup>3</sup>	50 unidades
dimensiones del estanque	10mx3mx1m
peso promedio animal	0,4 kg
Porcentaje de vísceras	0,17Kg

Fuente: Gaviria (2017)



**Cuadro 13.** Animales muestreados por estanque.

Factor	Valor	Parámetro
Z	1,96	95% de confianza
N	1.500	animales estanque
e	0,05	%
n	759	número de animales muestreados

Fuente: Gaviria (2017)

Con la evisceración de 759 animales se obtuvieron aproximadamente 52 Kg de vísceras, los cuales en el laboratorio fueron seleccionados por medio de procesos de cuarteo, garantizando la homogeneidad de la materia respecto al contenido de órganos, los subproductos restantes fueron usados para la obtención de otros productos de investigaciones del proyecto ALTPEZ.

## 5.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS

En el proceso de obtención de la muestra de vísceras, se encontraron residuos de trocos, piedras y alimento, los cuales fueron retirados con lo se aseguró eliminación de interferencias en el proceso como se muestran el Figura 9, es importante resaltar que los animales se colocan en un periodo de ayuno antes de ser sacrificados, el cual no debe ser mayor a 5 días (Bermejo-Poza *et al.*, 2017).

**Figura 9.** Limpieza de vísceras de trucha arcoíris.



Fuente: Gaviria (2017)

El análisis proximal de las vísceras de trucha mostró que son ricas en macromoléculas como aceite con un porcentaje del 69,1 % y proteína con 22,7 %, al los resultados de esta investigación con diferentes reportes sobre la composición nutricional en vísceras de trucha y otros peces (ver Cuadro 14), se determina que

el contenido de proteína en los subproductos es mayor que los valores obtenidos por Dumas (2017), sin embargo inferiores a lo reportado por Taheri (2013) (Dumas, de Lange, France, & Bureau, 2007; Taheri, Anvar, Ahari, & Fogliano, 2013), estas diferencias se pueden deber al entorno en el que crecen los animales, así como su alimentación (Shirahigue *et al.*, 2016). Aún más importantes es cuando se comparan los resultados con investigadores que analizaron el filete de la trucha arcoíris, los cuales obtuvieron valores de grasa del 27,7 % y 67,8 % para la proteína (Suárez *et al.*, 2014). Debido al importante contenido de proteína y lípidos en las vísceras, además de la calidad de los mismos, se deduce el potencial nutricional que se desecha al realizar una mala disposición de vísceras de trucha arcoíris en el municipio de Silvia cauca.

**Cuadro 14.** Análisis proximal de vísceras y filete de trucha arcoíris.

Determinación	Vísceras*	Vísceras**	Vísceras***	Filete**	Filete****
% Cenizas	3,2±0,1	2,3	2,7	4,6	1,8
% Proteína	27,2±0,1	22,7	52,2	67,8	63,6
% Grasa	69,1±0,3	72,7	45,6	27,7	28,2
% Fibra	0,01±0,0	N/D		N/D	
% Carbohidratos	0,32±0,0	N/D		N/D	

\* Gaviria (2017), \*\*A. Dumas et al., (2007), \*\*\*Taheri, Anvar, Ahari, y Fogliano (2012), \*\*\*\*M. Liu et al., (2004)

### 5.3. INACTIVACIÓN DE ENZIMAS ENDÓGENAS DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS POR TRATAMIENTO TÉRMICO

Órganos como estómagos e intestinos hacen parte de la composición de las vísceras de trucha arcoíris, en este material se encuentran sustancias capaces de degradar la proteína presente en los subproductos, generando interferencias no deseadas para la obtención de péptidos activos, por ejemplo en el estómago se tienen pepsinas (Wald, Rehbein, Beermann, Bußmann, & Schwarz, 2016), las cuales son enzimas proteolíticas que tienen como función hidrolizar la proteína ingerida por el animal, para así obtener los aminoácidos que se requieren para su nutrición, estas hidrolasas son capaces de actuar en un amplio rango de temperatura y pH (Wald, Rehbein, Beermann, Bußmann, & Schwarz, 2016), también existe la presencia de tripsinas y quimotripsinas que pueden afectar este proceso, además procesos post mortem activan otras proteasas que podrían hidrolizar parte del material. Todo este conjunto de reacciones no deseadas sobre la proteína, que se generan en vísceras de trucha, pueden ser controlada y/o inhibidas por medio de tratamiento térmico, que sea efectivo no solo en la eliminación de la activad

enzimática, sino a detener el crecimiento y proliferación de microorganismos (Vannabun, Ketnawa, Phongthai, Benjakul, & Rawdkuen, 2014). En la Figura 10, se muestran las vísceras de trucha arcoíris en baño termostático con lo que se garantizó la inactivación térmica.

**Figura 10.** Inactivación de enzimas endógenas.

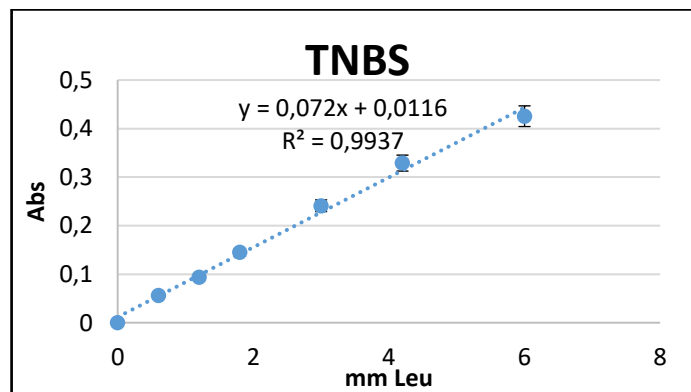


Fuente: Gaviria (2017)

### 5.3.1. Inactivación carga enzimática

El primer resultado que se obtuvo para determinar la actividad residual de enzimas endógenas fue la curva de calibración del método TNBS en el laboratorio de biotecnología de la universidad del Cauca, el cual permitió no solo cuantificar  $\alpha$ -aminos sino grados de hidrólisis, la curva se encuentra descrita por la ecuación  $Y=0,072x+0,0116$ , con un coeficiente de regresión línea de 0,9937, esta se describe en la Figura 11, la cual permitió la cuantificaron aminoácidos libres en muestras de vísceras e hidrolizados.

**Figura 11.** Curva de calibración método TNBS



Fuente: Gaviria (2017)

**Cuadro 15.** Datos curva de calibración método TNBS.

mM Leu	Día 1			Día 2			Día 3			PM	DE	CV
	Abs1	Abs2	Abs3	Abs 1	Abs2	Abs3	Abs1	Abs2	Abs3			
0	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
0,6	0,055	0,058	0,056	0,058	0,058	0,057	0,055	0,055	0,056	0,056	0,001	2,308
1,2	0,096	0,095	0,095	0,095	0,092	0,092	0,095	0,095	0,094	0,094	0,001	1,438
1,8	0,147	0,148	0,146	0,144	0,146	0,145	0,144	0,143	0,144	0,145	0,002	1,104
3,0	0,241	0,239	0,240	0,242	0,242	0,243	0,240	0,240	0,241	0,241	0,001	0,563
4,2	0,328	0,329	0,331	0,328	0,328	0,328	0,330	0,330	0,331	0,329	0,001	0,396
6,0	0,423	0,424	0,425	0,425	0,425	0,426	0,428	0,427	0,428	0,426	0,002	0,355

Fuente: Gaviria (2017)

En el Cuadro 16, se reportan la actividad de las enzimas endógenas para cada unidad experimental, la cantidad de aminoácidos liberados en el tiempo después de cada tratamiento térmico para todos los casos fue cero, por lo que se asume que las enzimas endógenas presentes en vísceras de trucha arcoíris se inactivan a temperaturas de 65 °C, esto se puede deber a que estas enzimas hacen parte de organismo que viven a temperaturas entre 12 a 15 °C (Carpenter, Fredrickson, Williams, Buhler, & Curtis, 1990) y las proteínas implícitas en el metabolismo de estas especies son termolábiles a temperaturas medianamente altas, sin embargo autores como Nalinanon *et al.*, (2010), reporta que enzimas como la pepsina presente en estómagos de atún blanco pierden hasta un 85 % de su actividad cuando son expuestas a una temperatura de 50 °C (Nalinanon, Benjakul, & Kishimura, 2010), lo cual concuerda con lo obtenido en esta investigación, en la que 65 °C fueron suficientes para inactivar la carga enzimática, 15 unidades por encima de lo reportado para atún, además, las vísceras que no se sometieron a ningún tratamiento (blanco), mostraron actividad con una velocidad de 39,5 mmolLeu/min.

**Cuadro 16.** Actividad enzimática endógena después de tratamiento térmico.

No	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Velocidad (mmolLeu/min)
1	65	15	0,0
2	65	30	0,0
3	80	15	0,0
4	80	30	0,0
5	94	15	0,0
6	94	30	0,0
<b>Blanco</b>	0	0	39,5

Fuente: Gaviria (2017)

### 5.3.2. Inactivación carga microbiológica

El análisis microbiológico de las vísceras de trucha arcoíris antes y después de cada tratamiento térmico se muestra en el Cuadro 17, en el cual se observa que las vísceras sin procesar y después de licuado tiene presencia de mesofilos, mohos y levaduras, además de coliformes, la presencia de estos organismos en los subproductos tiene origen en la manipulación en el momento de eviscerado, también se debe al agua usada para el avado de los animales, o bien a contaminación cruzada durante el proceso de recolección, se determinó que las vísceras licuadas tienen un mayor conteo, debido a que sufren un proceso de homogenización mecánico, el cual ayuda a la proliferación de microorganismos en el tejido, dando lugar a un mayor número de unidades formadoras de colonia en el presente análisis.

**Cuadro 17.** Análisis microbiológico

Tratamiento	UFC/mL		
	Mesofilos	Mohos y Levaduras	Coliformes Totales
<b>Vísceras sin procesar</b>	1,85 x 10 <sup>5</sup>	8,64 x 10 <sup>4</sup>	7,50 x 10 <sup>3</sup>
<b>Licuado de vísceras</b>	1,05 x 10 <sup>7</sup>	2,01 x 10 <sup>5</sup>	1,15 x 10 <sup>4</sup>
<b>65 °C *15 min</b>	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE
<b>65 °C*30 min</b>			
<b>80 °C*15 min</b>			
<b>80 °C*30 min</b>			
<b>94 °C*15 min</b>			
<b>94 °C*30 min</b>			

Fuente: Gaviria (2017)

El análisis microbiológico de los tratamientos térmicos arrojó como resultado ausencia de mesofilos, mohos-levaduras y coliformes en todos los casos, en este sentido se observó que todos los tratamientos fueron eficaces en el momento de eliminar la carga de microorganismos, con lo cual se demuestra que los subproductos sometidos a temperaturas desde y por encima de 65 °C, resultan libres de microorganismos como mesofilos, mohos-levaduras y coliformes, por tal razón y por lo obtenido en la inactivación de enzimas endógena se seleccionó la inactivación termina a 65°C por 15 min.

## 5.4. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE VÍSCERAS DE TRUCHA ARCOÍRIS

### 5.4.1. Obtención de aislado proteico

En la Figura 12, se muestran parte del proceso de obtención de aislado proteico, la etapa de centrifugación logró eliminar un 20 % del contenido graso del material, lo cual es conveniente según lo reportado por He (2013), quienes indican que el contenido de grasa en los hidrolizados de proteínas de pescado deben ser controlado y estar a bajas concentraciones, debido a que pueden afectar la actividad enzimática y acelerar procesos de oxidación (Bhaskar, Benila, Radha, & Lalitha, 2008; Shan He, Chris Franco y Wei Zhang, 2013).

**Figura 12.** Obtención de aislado proteico.



Fuente: Gaviria (2017)

El material seco terminó de ser desengrasado por el método de Soxhlet, etapa necesaria debido a que un contenido elevado de lípidos puede implicar reacciones de oxidación, mal olor o bien la aparición de sustancias tóxicas y colores no deseados. La eliminación de la fracción grasa con solventes orgánicos no solo ayuda a descartar este tipo de moléculas que son interferentes del proceso de hidrólisis, sino que también minimiza la degradación bacteriana de los hidrolizados de proteínas de pescado (Kristinsson y Rasco, 2000). Otros autores reportan procesos de prensado para la eliminación de aceite de la proteína de pescado sin embargo este tipo de procesos no eliminan en un gran porcentaje los lípidos, lo que conlleva a una inestabilidad oxidativa de la materia (Valenzuela B, Sanhueza C, & de la Barra D, 2012). El proceso de molienda y tamizado logro una partícula

homogénea y de menor tamaño con lo cual se garantiza una mayor superficie y dispersión del sustrato en el momento de la hidrólisis.

Al realizar el análisis proximal del aislado proteico (ver Cuadro 18) se determinó el porcentaje de proteína, es de 84,74 %, lo que indica que el proceso de obtención de aislado proteico fue eficiente, aumentando el contenido de proteína en un 57,54 % respecto a las vísceras, el contenido de grasa del aislado proteico fue del 2,84 %, presentando una disminución del 66,26 %, necesario para que la enzima no sea encapsulada por el contenido lipídico o bien genere problemas de rancidez oxidativa.

**Cuadro 18.** Análisis proximal de aislado.

Determinación	Gaviria-2016	Huang-2015
% Cenizas	8,82±0,03	-
% Proteína	84,74±0,04	82,06
%Grasa	2,84±0,06	-
% Fibra	1,17±0,07	-
%Carbohidratos	2,43	-

Fuente: Gaviria (2017)

El contenido de aminoácidos presentes en las proteínas de vísceras de trucha arcoíris obtenidos en esta investigación se muestran en el Cuadro 33, en este se observa un contenido balanceado entre aminoácidos hidrofóbicos como hidrofílicos, al comparar los resultados con el análisis de musculo de vísceras obtenido por Kim (2012), se muestra que aminoácidos como serina, ácido glutámico y prolina, se encuentran en menor porcentaje que lo determinado en vísceras en esta investigación, por otro lado existen porcentajes similares en arginina, tirosina, valina, metionina, isoleucina, fenilalanina y triptófano, lo que demuestra el potencial nutricional y funcional que contienen las proteínas de vísceras de trucha, en este sentido se podría pensar en el uso de este material para la dieta de otras especies como la tilapia roja, la cual también es producida en el departamento del Cauca, los aminoácidos esenciales para esta especie son lisina, metionina, cistina, treonina, arginina, fenilalanina, tirosina, histidina, isoleucina, leucina y triptofano (Roslan et al., 2014), estos aminoácidos se resaltan en el Cuadro 19 y representan un 46,5 % del contenido de aminoácidos presentes en proteínas de vísceras de trucha, siendo un porcentaje importante que se está siendo desperdiciando cuando los subproductos son arrojados a campo abierto y fuentes hídricas (S.-R. Kim & Byun, 2012).

**Cuadro 19.** Aminoácidos presentes en de vísceras y musculo de trucha.

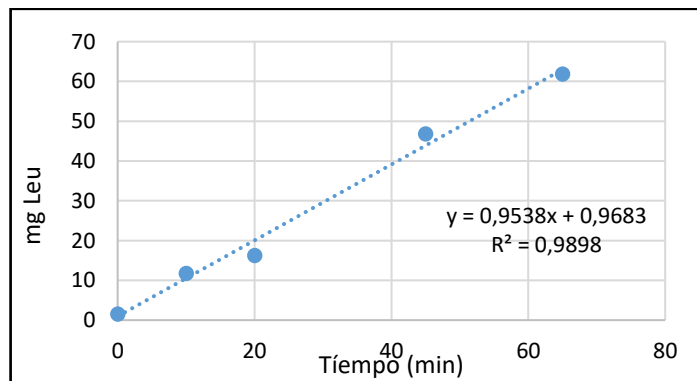
Aminoácidos esenciales para Tilapia <i>Oreochromis sp.</i>	*%Aminoácidos vísceras de trucha	**%Aminoácidos musculo de trucha
Histidina	2,3	
Treonina	3,3	5,9
Arginina	10,2	12,1
Tirosina	3,5	3,3
Metionina	3	3,8
Lisina	8,4	12,1
Isoleucina	4,9	4,8
Leucina	7,8	11,1
Fenilalanina	4,5	4,3
Triptófano	0,6	0,2
<b>Total</b>	<b>46,5%</b>	<b>57,6</b>

\*Gaviria (2017) \*\*(S.-R. Kim & Byun, 2012)

#### 5.4.2. Diseño experimental para grado de hidrólisis

En la Figura 13, se observa la gráfica de actividad enzimática de Protamex® sobre proteína de soya, esta describe una relación directa entre al aumento de aminoácidos liberados durante el tiempo en el que fue evaluada, lo que indica que la hidrolasa se encuentra activa, la pendiente de la curva indicó que se liberaron 0,954 mg/min de leucina.

**Figura 13.** Actividad de enzima protamex®.



Fuente: Gaviria (2017)

Los resultados de grado de hidrólisis para cada unidad experimental del diseño se presentan en el Cuadro 20, los grados de hidrólisis se encuentran en un rango de



GH de 3 a 50 %, la influencia y efecto de cada factor se observa en análisis de varianza descrito en el Cuadro 21.

**Cuadro 20.** Resultados diseño experimental-GH

No	Tiempo (h)	[E/S]	Temperatura (°C)	% G.H
1	12,00	3,00	40,00	36,22
2	3,82	5,50	50,00	43,11
3	44,18	5,50	50,00	14,25
4	24,00	5,50	33,18	3,61
5	36,00	8,00	60,00	32,57
6	24,00	5,50	50,00	40,05
7	24,00	5,50	50,00	38,96
8	24,00	5,50	50,00	41,90
9	24,00	5,50	50,00	38,90
10	24,00	5,50	50,00	41,73
11	24,00	5,50	50,00	38,63
12	24,00	1,30	50,00	18,65
13	12,00	8,00	60,00	37,82
14	36,00	3,00	60,00	37,09
15	36,00	8,00	40,00	34,39
16	24,00	5,50	66,82	29,38
17	36,00	3,00	40,00	2,53
18	24,00	5,50	50,00	45,98
19	12,00	8,00	40,00	50,36
20	24,00	9,70	50,00	33,94
21	24,00	5,50	50,00	38,12
22	24,00	5,50	50,00	38,53
23	12,00	3,00	60,00	38,11

Fuente: Gaviria (2017)

El análisis de varianza para este diseño experimental (Cuadro 21), con un nivel de confianza del 95 %, arrojó como resultado que los factores de tiempo, reacción [E/S] y temperatura influyen sobre el proceso de hidrólisis, lo cual es coherente al tratarse de una reacción enzimática, debido a que las enzimas son proteínas, estas son termolábiles, y su estructura terciaria la cual está ligada a la actividad, se ve afectada con cambios de temperatura, otro factor importante es la concentración de enzima, su influencia se debe a la disposición de sitios activos para la hidrólisis de los enlaces peptídicos que componen la proteína del aislado, por último y con mayor influencia se presenta el tiempo, al igual que todas las reacciones químicas este factor influye de manera directa, o bien determina el porcentaje de conversión de sustrato a producto, teniendo incidencia directa sobre el proceso. El valor de  $R^2$  fue

de 82,9392, lo cual indica que el modelo matemático se ajusta al modelo experimental debido a una buena correlación.

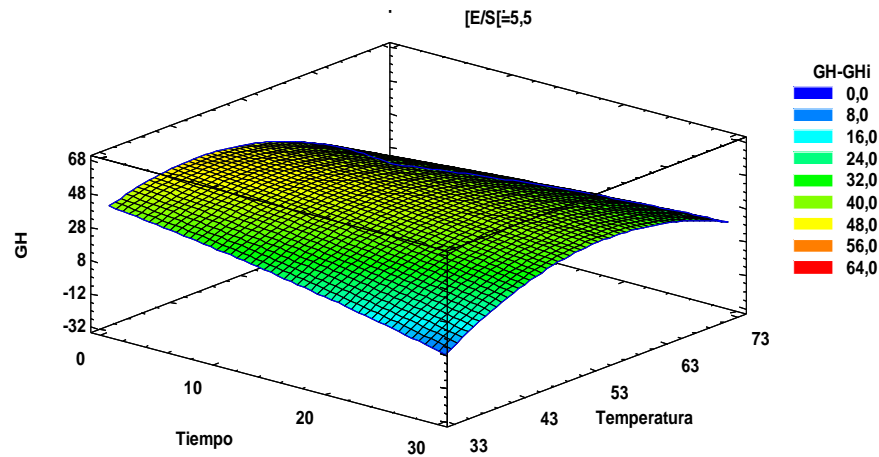
**Cuadro 21.** Análisis de Varianza para GH.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Tiempo	799,165	1	799,165	18,08	0,0009
B: [E/S]	327,761	1	327,761	7,42	0,0174
C: Temperatura	313,55	1	313,55	7,09	0,0195
AA	55,5735	1	55,5735	1,26	0,2824
AB	22,7374	1	22,7374	0,51	0,4859
AC	235,391	1	235,391	5,33	0,0381
BB	116,97	1	116,97	2,65	0,1278
BC	322,847	1	322,847	7,30	0,0181
CC	606,572	1	606,572	13,72	0,0026
Error total	574,599	13	44,1999		
Total (corr.)	3367,95	22			

Fuente: Gaviria (2017) R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 82,9392 porciento

En la figura 15 se muestra la superficie de respuesta obtenida, con la cual se maximiza la respuesta a partir de los tres factores, esta se describe por la siguiente ecuación  $G.H = -162.629 - 2.58313 * \text{Tiempo} + 18.0885 * [E/S] + 6.96976 * \text{Temperatura} - 0.0129867 * \text{Tiempo}^2 + 0.0562083 * \text{Tiempo} * [E/S] + 0.0451979 * \text{Tiempo} * \text{Temperatura} - 0.434129 * [E/S]^2 - 0.25405 * [E/S] * \text{Temperatura} - 0.0617814 * \text{Temperatura}^2$ , esta ecuación permite el modelamiento de la reacción de hidrólisis de proteínas en vísceras de trucha, con lo cual se pueden estudiar la propiedades activas de los hidrolizados a diferentes GH, maximizar la respuesta, o determinar las condiciones de reacciones para obtener cualquier grado de hidrólisis en teoría.

**Figura 14.** Superficie de respuesta para GH.



Fuente: Gaviria (2017)

En la actualidad el método de superficie de respuesta es un modelo matemático altamente utilizado para optimizar procesos de hidrólisis enzimática en el caso del aprovechamiento de subproductos. En la Figura 14 se observa la superficie de respuesta obtenida, la cual nos muestra el mayor grado de hidrólisis a tiempos por debajo de las 5 horas y a una concentración de enzima mayor al 8 %, al aumentar el tiempo se observa una disminución el GH, comportamiento similar a lo obtenido por Bhaskar *et al.*, (2008), quien optimizó la hidrólisis enzimática de proteínas viscerales de residuos de *Catla (Catla catla)* para la preparación de hidrolizado utilizando Alcalase, esta es una proteasa comercial al igual que Protamex, lo cual se puede deber al encapsulamiento de aminoácidos libre y péptidos de cadena corta por parte de la fase grasa en este tipo de material biológico (Bhaskar *et al.*, 2008), generando interferencias al momento de cuantificar la cantidad de grupos aminos libres, disminuyendo la disponibilidad de los mismos, en algunos casos esta capacidad que tienen los péptidos para unirse a la fase lipídica es aprovechada para la generación de emulsiones o mejorar sabores (Halim, Yusof, & Sarbon, 2016). Este investigador también usó un diseño factorial, sus factores fueron temperatura, pH y la enzima al sustrato nivel, los valores óptimos para la hidrólisis de 1,5 % (v/w) para la relación de enzima, la cual es baja en comparación con la obtenida en esta investigación sin embargo se debe tener en cuenta que el sustrato juega un papel importante en esta reacción, debido a que la conformación de la proteína nativa genera una mayor o menor disposición de enlaces peptídicos susceptibles a hidrolizarse, afectando directamente la concentración de la enzima requerida para el fraccionamiento, el valor del pH fue de 8,5, la temperatura de 50 °C esta última característica es particular de cada enzima por lo cual es difícil realizar una

compración, el tiempo de hidrólisis fue 135 min, casi 60 minutos menos que lo obtenido en esta investigación (ver Cuadro 22), las condiciones óptimas llevaron a tener un grado de hidrólisis cerca de 50 % (Bhaskar *et al.*, 2008), lo cual es similar a lo encontrado en este caso, obteniendo un GH del 56 %, cuando se llevó a cabo el seguimiento de la reacción de hidrólisis a condiciones óptimas, como se muestra en la Figura 15. Otras investigaciones que hidrolizaron concentrado de pescado, reportan grados de hidrólisis del 68 % obtenido a través de la optimización del proceso por medio de superficie de respuesta usando como enzima Flavourzyme™, la condiciones de reacción estimadas fueron 45 °C, por un tiempo de 6 h, además de una relación enzima sustrato del 20 % (Nilsang, Lertsiri, Supphantharika, & Assavanig, 2005). Los resultados con los obtenidos en esta investigación, muestran un alto grado de hidrólisis, por lo que se presume que las proteínas presentes en vísceras de trucha arcoíris tienen una conformación que las hacen susceptibles a ser hidrolizadas enzimáticamente.

**Cuadro 22.** Valores óptimos de cada factor.

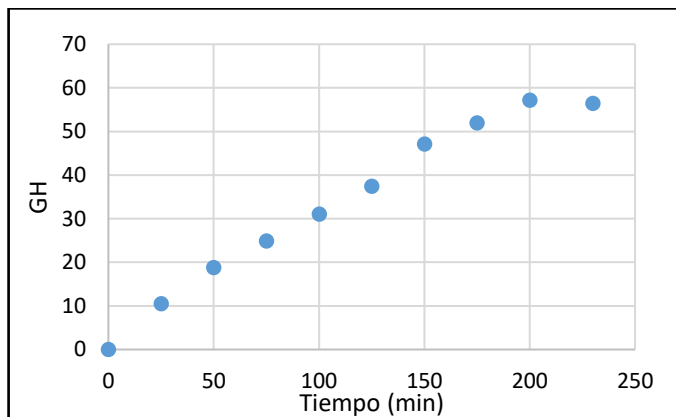
Factor	Óptimo
Tiempo	3,82
[E/S]	9,70
Temperatura	37,85

Fuente: Gaviria (2017)

Bajo las condiciones óptimas se llevó a cabo el seguimiento de grado de hidrólisis frente al tiempo, el cual se describe en la Figura 15, se observa que durante los primeros 75 minutos el comportamiento es casi lineal, sin embargo después de 100 minutos la velocidad disminuye hasta que cerca de los 175 minutos, el comportamiento fue constante, posiblemente existe una disminución de la concentración de enlaces peptídicos susceptibles a ser hidrolizados por la enzima, Toopcham *et al.*, (2017) encontró GH por encima del 30 % usando como sustrato proteína picada de tilapia, y caseína como enzima proteolítica SK1-3-7, estos hidrolizados mostraron Actividad inmunomoduladora (Toopcham *et al.*, 2017), el tiempo de reacción se mantuvo constante después de 8 horas, aproximadamente 4 horas más que la presente investigación, sin embargo se debe tener en cuenta que el sustrato es diferente al igual que enzima utilizada. En este sentido existen reportes donde este tipo de productos al ser incluidos en dietas han mostrado beneficios en la producción de otras especies, Cai *et al.*, (2015) utilizó hidrolizados *Theragra chalcogramma* mediante tratamiento enzimático con Alcalase y flavourzyme, para ser incluidos en dietas de otras especies, obteniendo como

resultado un aumento en las enzimas digestivas, además de una mejor función secretora del páncreas de los peces (Cai *et al.*, 2015).

**Figura 15.** Grado hidrólisis Vs Tiempo.



Fuente: Gaviria (2017)

Algunas investigaciones en las que se usó Protamex como enzima para hidrolizar subproductos piscícolas, obtuvieron resultados positivos al caracterizar los hidrolizados en términos de solubilidad, capacidad emulsionante, formación de espuma y propiedades térmicas (Y. Liu *et al.*, 2014). Batista *et al.*, (2010) utilizó diferentes concentraciones de Protamex para la obtención de hidrolizados empleando como sustrato subproductos de sable negro, obtenido como resultado una alta capacidad antioxidante a grados de hidrólisis del 57 % (Batista, Ramos, Coutinho, Bandarra, & Nunes, 2010), otros autores reportan el uso de proteínas de vísceras de trucha arcoíris sustrato para la obtención de productos con valor agregado (Wald, Schwarz, *et al.*, 2016), Taheri *et al.*, (2013) realizó la comparación de las propiedades funcionales hidrolizados proteicos de subproductos de aves de corral y vísceras de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), encontrando que los hidrolizados de subproductos de trucha arcoíris tienen mejores propiedades funcionales que los de aves de corral (Taheri *et al.*, 2013).

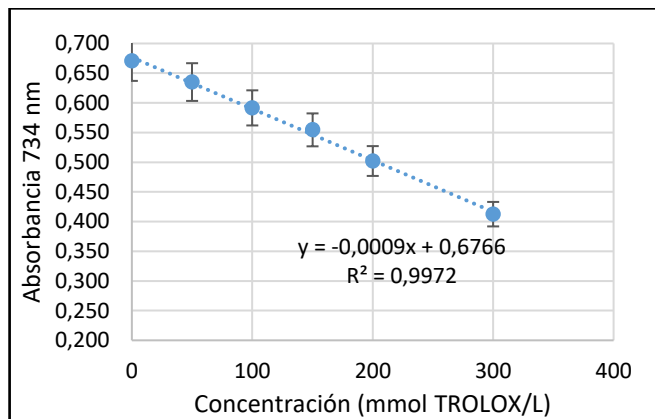
## 5.5. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE (CA)

### 5.5.1. Métodos ABTS

La curva de calibración obtenida del método ABTS, esta descrita por medio de la ecuación  $Y = -0,0009X + 0,6766$ , esta presenta una pendiente negativa, esto se debe

a que a una mayor concentración del antioxidante en este caso trolox, absorbe mayor cantidad de radical ABTS, y entre menor cantidad de radical en el medio de reacción más baja su absorbancia, la ecuación mostró un coeficiente de regresión lineal de 0,9972, indicando que existe una relación directa entre la concentración del antioxidante y la absorbancia del radical, la curva se describe en la Figura 16.

**Figura 16.** Curva de calibración método ABTS.



Fuente: Gaviria (2017)

**Cuadro 23.** Datos curva de calibración ABTS.

Trolox $\mu\text{M}$	Día 1			Día 2			Día 3			Pm	DE	CV
	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 1	Abs 2	Abs 3			
300	0,413	0,412	0,410	0,412	0,411	0,413	0,414	0,413	0,415	0,413	0,002	0,366
200	0,501	0,498	0,503	0,505	0,503	0,503	0,502	0,499	0,501	0,502	0,002	0,434
150	0,556	0,553	0,552	0,557	0,557	0,560	0,556	0,552	0,550	0,555	0,003	0,576
100	0,590	0,588	0,592	0,598	0,597	0,600	0,588	0,590	0,589	0,592	0,005	0,783
50	0,634	0,633	0,636	0,635	0,637	0,638	0,635	0,634	0,630	0,635	0,002	0,370
0	0,669	0,667	0,673	0,671	0,670	0,669	0,672	0,675	0,677	0,671	0,003	0,472

Fuente: Gaviria (2017)

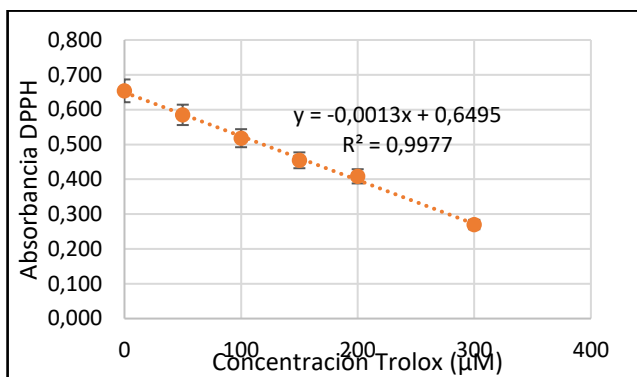
En el Cuadro 23, se describen las absorbancias obtenidas por triplicado para cada estándar de trolox, por tres días diferentes. A partir de la desviación estándar, coeficiente de variación y regresión lineal se determinó que el método es confiable para el uso predicho, sin embargo se observó que uno de los parámetros importantes para la estabilidad del radical ABTS, es el tiempo de reacción con el persulfato de potasio, quien cumple el papel de oxidante, para la obtención del bi-

radical, lo que lo convierte en un método muy sensible, por lo cual se debe realizar un ajuste en la absorbancia del reactivo para llevarlo aproximadamente a 0,700.

### 5.5.2. Método DPPH

En la Figura 17, se muestra la curva de calibración por el método DPPH, esta se describe por la ecuación  $Y = -0,0013X + 0,6495$ , la cual tiene una pendiente negativa por la razón ya descrita en el método ABTS, el coeficiente de regresión lineal tiene un valor 0,9977, lo cual indica que existe una relación directa entre la concentración del antioxidante y la absorbancia del radical.

**Figura 17.** Curvas de calibración DPPH.



Fuente: Gaviria (2017)

Los datos correspondientes a la curva de calibración para DPPH se describen en el Cuadro 24, la desviación estándar, coeficiente de variación y regresión lineal demostraron que el método muestra parámetros de confiabilidad, sin embargo como precauciones y acciones tomadas se encuentra; purgar y secar la celda de cuarzo con metanol, realizar preparación *in situ* de los reactivos, llevara a cabo la preparación de reactivos y lectura sin incidencia directa de la luz, ajustar la absorbancia del reactivo DPPH a un valor fijo.

**Cuadro 24.** Datos curva de calibración DPPH.

Trolox $\mu\text{M}$	Día 1			Día 2			Día 3			Pmd	DE	CV
	Abs 1	Abs2	Abs3	Abs 1	Abs2	Abs3	Abs 1	Abs 2	Abs 3			
300	0,268	0,271	0,272	0,268	0,269	0,267	0,271	0,273	0,270	0,270	0,002	0,753
200	0,412	0,406	0,408	0,409	0,409	0,408	0,407	0,409	0,410	0,409	0,001	0,314
150	0,454	0,456	0,454	0,453	0,456	0,457	0,456	0,454	0,453	0,455	0,002	0,341
100	0,517	0,518	0,516	0,519	0,520	0,517	0,517	0,517	0,519	0,518	0,001	0,262
50	0,587	0,588	0,583	0,584	0,582	0,582	0,586	0,587	0,586	0,585	0,002	0,396
0	0,655	0,653	0,657	0,655	0,654	0,654	0,656	0,655	0,656	0,655	0,001	0,200

Fuente: Gaviria (2017)

### 5.5.3. Medida de la capacidad antioxidante y diseño experimental

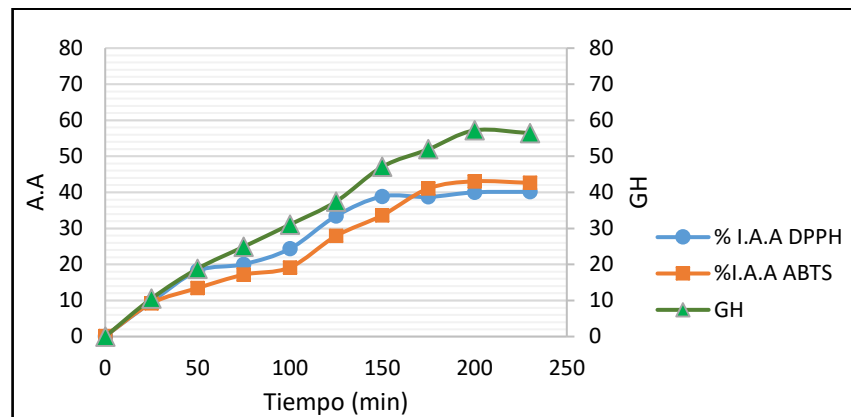
En la industria alimentaria la oxidación de grasas y aceites es un tema que preocupa, debido a que este tipo de reacciones pueden generar sabores amargos olores indeseables y sustancias tóxicas, este tipo de reacciones oxidativas también se hacen presente en organismos vivos, lo cual se conoce como estrés oxidativo generado por especies radicalarias de oxígeno, a lo que se le ha atribuido mutación del ADN, malformaciones de proteínas y oxidación de fosfolípidos, teniendo consecuencias fatales en muchos caso por desarrollo de enfermedades terminales, antioxidantes sintéticos son muy usados, tales como hidroxianisol butilado (BHA) y Hidroxitolueno butilado (BHT), se utilizan actualmente para preservar los productos alimenticios, a pesar que estos antioxidantes sintéticos muestran una mayor capacidad de absorber radicales que antioxidantes naturales ( $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, etc.), se presume que son responsables de daño hepático y carcinogénesis, por lo cual la búsqueda de nuevos compuestos con alta capacidad antioxidante se ha hecho necesaria. Los péptidos activos han mostrado en los últimos años esta capacidad, los cuales se han obtenido de proteínas usadas en alimentación por medio de procesos de hidrólisis, por lo cual es un área que puede generar un gran impacto en este campo.

Los resultados de la de la capacidad antioxidante de péptidos obtenidos de la hidrólisis enzimática de proteínas de vísceras de trucha arcoíris, determinada por los métodos ABTS y DPPH, a condiciones óptimas de hidrólisis se muestra en la Figura 18, en la cual se observa que a medida que aumenta el grado de hidrólisis hay una inhibición mayor de los dos radicales evaluados, es decir a mayor grado de hidrólisis existe una mayor capacidad antioxidante, logrando una inhibición por



encima del 40 % tanto para ABTS como para DPPH, por lo cual se asume que péptidos de cadenas cortas logra una mejor capacidad de neutralizar radicales libres, mientras que péptidos conformados por muchos aminoácidos o bien proteínas de alto peso molecular pierden su capacidad antioxidante, posiblemente por impedimentos estéricos que dificultan la interacción entre la molécula radicalaria y el antioxidante.

**Figura 18.** Relación del GH y la capacidad antioxidante.



Fuente: Gaviria (2017)

Los resultados de esta investigación concuerdan con los obtenidos por Batista *et al.* (2010) quien concluyo que la capacidad antioxidante determinada por el método DPPH de hidrolizados de subproductos de *Aphanopus carbo* obtenidos enzimáticamente con protamex, fue mayor a medida que se aumentó el grado de hidrólisis (Batista *et al.*, 2010). A pesar de que no todos los investigadores coinciden que un aumento en el grado de hidrólisis genera una mayor capacidad antioxidante, muchos resultados concuerdan con que fracciones más pequeñas de proteínas aumentan las propiedades donadores de hidrógeno de péptidos activos, por lo cual podrían reaccionar con radicales libres para convertirlos en productos más estables y terminar la reacción de oxidación en cadena (Chang *et al.*, 2017; Morales-Medina *et al.*, 2016).

**Cuadro 25.** Porcentaje de inhibición radicales DPPH y ABTS.

Tiempo (min)	GH	% inhibición DPPH	%inhibición ABTS
0	0	0	0
25	11	10	9
50	19	18	13
75	25	20	17
100	31	24	19
125	37	33	28
150	47	39	34
175	52	39	41
200	57	40	43
230	56	40	43

Fuente: Gaviria (2017)

Se observa en el Cuadro 25, que se lograron obtener porcentajes de inhibición del 40 y 43 % para los radicales DPPH y ABTS respectivamente, estos se logran al mayor tiempo de seguimiento y bajo las mejores condiciones de reacción encontradas en el numeral 5.4.2, sin embargo se determinó que el tiempo se encuentra fuera del nivel bajo para este factor en el diseño experimental planteado, por lo cual se hizo necesario mover el plano experimental para estudiar el comportamiento de la reacción de hidrólisis de proteínas presentes en vísceras de trucha con protamex®. Los resultados obtenidos de este diseño se presentan en el siguiente numeral.

Al determinar la actividad antioxidante de cada una de las unidades experimentales planteadas en el diseño experimental, se obtuvieron los siguientes resultados:

**Cuadro 26.** Diseño experimental respuesta % inhibición.

Bloque 1			Bloque 2			Bloque 3		
Tiempo (h)	[E/S]	% II DPPH	Tiempo (h)	[E/S]	% II DPPH	Tiempo (h)	[E/S]	% II DPPH
2,00	5,50	37,26	2,00	5,50	37,11	2,00	5,50	36,97
3,00	3,00	39,32	3,00	3,00	38,88	3,00	3,00	39,76
3,00	8,00	41,38	3,00	8,00	41,09	3,00	8,00	41,53
1,00	8,00	32,11	1,00	8,00	31,66	1,00	8,00	32,25
3,41	5,50	41,83	3,41	5,50	42,42	3,41	5,50	42,86
2,00	1,96	36,82	2,00	1,96	36,38	2,00	1,96	36,23
2,00	9,04	36,67	2,00	9,04	36,82	2,00	9,04	36,38
0,59	5,50	15,76	0,59	5,50	15,17	0,59	5,50	15,32
1,00	3,00	15,76	1,00	3,00	15,86	1,00	3,00	15,90
2,00	5,50	37,56	2,00	5,50	37,56	2,00	5,50	37,26

Fuente: Gaviria (2017)

Al ingresar los datos al statgraphics se obtienen los siguientes resultados:

**Cuadro 27.** Análisis de Varianza para DPPH.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Tiempo	1886,35	1	1886,35	305,88	0,0000
B:[E/S]	126,787	1	126,787	20,56	0,0002
AA	259,011	1	259,011	42,00	0,0000
AB	150,238	1	150,238	24,36	0,0001
BB	3,6728	1	3,6728	0,60	0,4485
bloques	0,15302	2	0,07651	0,01	0,9877
Error total	135,671	22	6,16688		
Total (corr.)	2588,61	29			

Fuente: Gaviria (2017) R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 93,0913 por ciento

El análisis ANOVA con un nivel de confianza del 95 %, mostró que el tiempo es el factor más influyente, situación similar cuando se usa como respuesta el grado de hidrólisis, esto se debe a que existe un crecimiento en el grado de hidrólisis y por ende la capacidad antioxidante hasta un valor constante, esta relación directa influye directamente sobre la hidrólisis. La optimización del proceso por parte del programa muestra los siguientes valores:

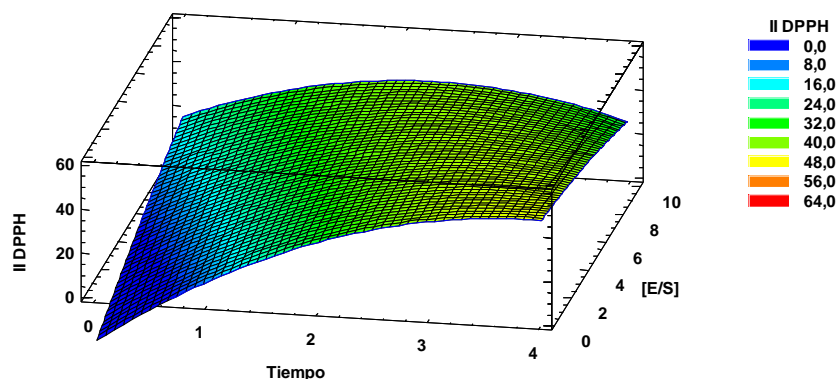
**Cuadro 28.** Valores óptimos para la mayor CA.

Factor	Óptimo
Tiempo	3,414
[E/S]	1,964

Fuente: Gaviria (2017)

La superficie obtenida para maximizar la actividad antioxidante se muestra a continuación:

**Figura 19.** Superficie de respuesta para actividad antioxidante.



Fuente: Gaviria (2017)

En Figura 19, se muestra la superficie de respuesta obtenida del porcentaje de inhibición %II Vs el tiempo y la concentración de enzima, grafica esta descrita por la ecuación  $\%II = -20,9577 + 34,0332 * \text{Tiempo} + 4,66084 * [E/S] - 1,41533 * \text{Tiempo}^2 - 1,41533 * \text{Tiempo} * [E/S] - 0,0828004 * [E/S]^2$ , el análisis de varianza y la superficie de respuesta muestran que el tiempo es el factor más influyente, se observa que se alcanza un máximo de porcentaje de inhibición a un valor de 3,5 horas, a una concentración de enzima cercana al 2 %, esto concuerda con lo reportado, debido a que péptidos más pequeños o bien un mayor grado de hidrólisis generan la mayor capacidad antioxidante. Como se ha estudiado a partir de la literatura y los resultados de esta investigación, las condiciones empleadas para la hidrólisis como el tiempo de reacción, la temperatura, la concentración de enzima y pH influyen sobre el grado de hidrólisis, afectando el tamaño y composición de péptidos (Ktari *et al.*, 2013), lo cual modula su actividad biológica, a partir de los resultados obtenidos se determinó que en el caso de la proteína de vísceras de trucha arcoíris aumenta su capacidad antioxidante al ser hidrolizadas con protamex, esta reacción al estar modulada por el diseño experimental planteado, es controlada lo que garantiza la reproducibilidad (Sila & Bougatef, 2016), en este sentido podemos hablar de una correlación directa entre el grado de hidrólisis de proteínas de subproductos y el grado de hidrólisis.

Los hidrolizados obtenidos bajo las condiciones del Cuadro 28, con un pH de 7 y a una temperatura de 37,85 °C, se les determinó la capacidad antioxidante por los métodos DPPH y ABTS, se encontraron porcentajes de inhibición del 41 % para DPPH y 43 % para TNBS, lo que corresponde a 183,1 µMTrolox y 317,67 µMTrolox, obtenidos al interpolar las absorbancias en las curvas de calibración de cada método, que al comparar con otros autores muestran gran capacidad de absorción

de radicales, Borawska *et al.* (2016), obtuvieron un valor de capacidad antioxidante por método ABTS de 232.3 MTrolox/g, al hidrolizar proteína de carpa (*Cyprinus carpio L*) (Borawska *et al.*, 2016), Morales *et al.*, (2016) logro obtener un porcentaje de inhibición casi del 70 % del radical DPPH con una concentración de 10 mg/mL de hidrolizado, mientras que los hidrolizados obtenidos en esta investigación alcanzaron un 41 % de absorción del radical a una concentración aproximada de 40 mg/mL (Morales-Medina *et al.*, 2016), se destacan los resultados obtenidos cuando se comparan con los péptidos obtenidos por Rasa Šližyte *et al.*, (2016), quien obtuvo hidrolizados con protamex, papaína, bromelinia entre y otras enzimas las proteínas presentes en espinas dorsales de salmón desgrasadas, obteniendo porcentajes de inhibición del menores al 38 % para el radical DPPH (Šližytė *et al.*, 2009). Con la necesidad de analizar la interacción entre el grado de hidrólisis y la capacidad antioxidante se llevó acabo el análisis del diseño experimental planteado en la página 49, usando como respuesta el grado de hidrólisis, los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 29.

**Cuadro 29.** Resultados diseño experimental, respuesta grado de hidrólisis.

Bloque 1			Bloque 2			Bloque 3		
Tiempo (h)	[E/S]	% GH	Tiempo (h)	[E/S]	% GH	Tiempo (h)	[E/S]	% GH
2,00	5,50	46,05	2,00	5,50	45,44	2,00	5,50	45,64
3,00	3,00	49,03	3,00	3,00	49,10	3,00	3,00	49,21
3,00	8,00	54,99	3,00	8,00	54,56	3,00	8,00	54,92
1,00	8,00	35,46	1,00	8,00	35,03	1,00	8,00	35,53
3,41	5,50	55,53	3,41	5,50	55,61	3,41	5,50	55,67
2,00	1,96	37,44	2,00	1,96	36,82	2,00	1,96	37,49
2,00	9,04	44,66	2,00	9,04	44,68	2,00	9,04	44,39
0,59	5,50	1,47	0,59	5,50	1,63	0,59	5,50	1,50
1,00	3,00	17,18	1,00	3,00	17,12	1,00	3,00	17,17
2,00	5,50	45,70	2,00	5,50	45,42	2,00	5,50	45,63

Fuente: Gaviria (2017)

El análisis de varianza ANOVA (ver cuadro 31), mostró que el tiempo es el factor más influyente sobre el proceso de hidrólisis, la optimización de la reacción de hidrólisis, determinó que a un tiempo de 2,98 horas y una concertación de enzima sustrato de 6,4 se alcanza el mayor grado de hidrólisis, se resalta la concentración de enzima es mayor para optimizar el proceso que lo encontrado cuando se toma el porcentaje de inhibición como respuesta, este comportamiento se puede deber a que la disposición de sustrato es elevada, por lo cual se requiere un contenido importante de enzima para maximizar el GH, sin embargo, el tiempo es menor, lo cual es conveniente.

**Cuadro 30.** Análisis ANOVA grado de hidrólisis.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo	6135,02	1	6135,02	322,41	0,0000
B:[E/S]	440,022	1	440,022	23,12	0,0001
AA	760,623	1	760,623	39,97	0,0000
AB	116,688	1	116,688	6,13	0,0214
BB	22,287	1	22,287	1,17	0,2909
bloques	0,25224	2	0,12612	0,01	0,9934
Error total	418,623	22	19,0283		
Total (corr.)	7932,97	29			

Fuente: Gaviria (2017). R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 93,0439 por ciento

**Cuadro 31.** Valores de los factores para maximizar el grado de hidrólisis.

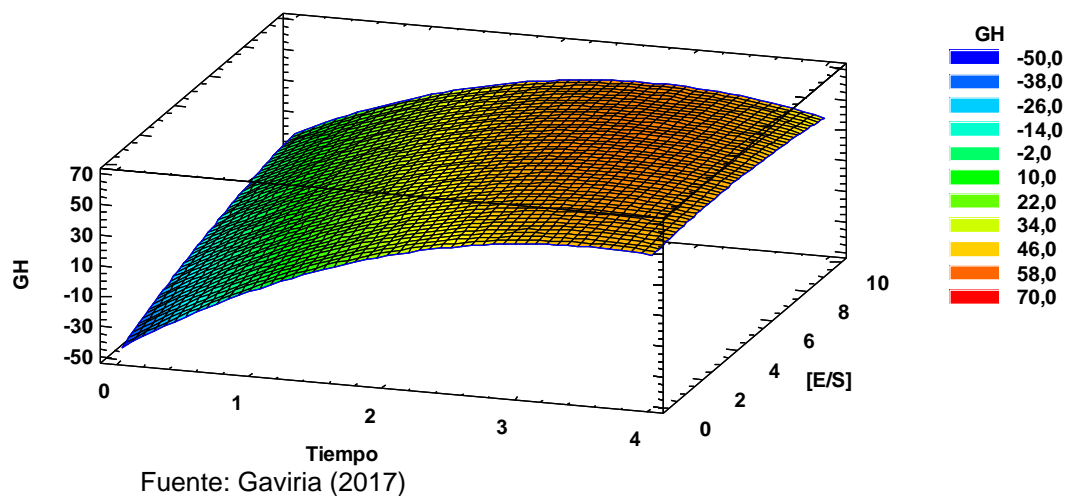
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Tiempo	0,586	3,414	2,971
[E/S]	1,964	9,035	6,733

Fuente: Gaviria (2017)

La superficie de respuesta muestra que a un tiempo de 3 horas y una concentración de enzima cerca de 6 se grado de hidrólisis, el comportamiento se esta superficie es similar a la encontrada para la capacidad antioxidante, confirmando la correlación directa entre estas dos propiedades. La acción antioxidante de péptidos activos es atribuida a efectos en cadena o cooperativos de varios mecanismos, entre ellos la quelación de iones, absorción de radicales libres e inhibición de la peroxidación de lípidos, además del atrapamiento de compuestos radicalarios de oxígenos y transferencia de electrones, esto debido a la innumerable composición química y propiedades que tienen los péptidos. La actividad antioxidante de péptidos se ha atribuido la longitud de cadena e hidrofobicidad, así como a ciertos aminoácidos. La mayoría de péptidos antioxidantes están compuestos de 2-10 residuos de aminoácidos, siendo los que presentan mayor capacidad antioxidante los compuestos por triptofano, tirosina y tetionina, seguidos de cisteína, histidina y fenilalanina. Esto debido a que los residuos de aminoácidos aromáticos pueden donar fácilmente protones a radicales deficientes en electrones y participar directamente en la eliminación de radicales. También se presume que la actividad antioxidante de péptidos que contienen histidina se debe a la donación de protones, atrapamiento de radicales y/o capacidad de quelación de iones metálicos, el contenido de triptófano, tirosina y fenil alanina en la proteína de vísceras de trucha equivale a un porcentaje de 8,54 % (ver Cuadro 33) valor positivo para la obtención de péptidos antioxidantes. Hasta la fecha, falta evidencia para explicar la relación

entre las características estructurales de los péptidos, tales como el tamaño molecular, hidrofobicidad, la composición de aminoácidos y la secuencia, con su capacidad antioxidante y mecanismos de reacción, sin embargo un rango de pesos entre 0,5 a 3 kDa, se ha sugerido como un factor crucial que afecta a la actividad antioxidante de los hidrolizados de proteínas (Samaranayaka & Li-Chan, 2011), lo cual se garantiza en lo obtenido en esta investigación con grados de hidrólisis mayores al 50 %. Dentro de la composición de aminoácidos de vísceras de trucha arcoíris se observa la presencia de histidina, a la cual se le ha atribuido la capacidad quelante y atrapamiento de radicales por parte del anillo de imidazol, Samaranayaka *et al.*, (2011) determinó que péptidos de bajo peso molecular en el rango de 1.000-3.000 Da serían más eficaces para interactuar con los radicales para la terminación de los ciclos de propagación de la peroxidación lipídica (Samaranayaka & Li-Chan, 2011), lo cual concuerda con lo obtenido, debido a que un mayor GH genera cadenas con menor peso molecular lo que aumento la capacidad antioxidante, es este sentido Chi *et al.*, (2015) estudió las actividades antioxidantes de los tres péptidos aislados. demostraron que el menor tamaño molecular (389,41, 546,63, 432,52 y Da) y un contenido de aminoácidos hidrófobos y/o aromáticos en sus secuencias podrían contribuir a las actividades antioxidantes (Chi, Wang, Wang, *et al.*, 2015). Con los anteriores resultados se muestra que se pudo optimizar la respuesta de grado de hidrólisis, encontrando los valores de tiempo y concentración de enzima que maximizan la respuesta descritos en el Cuadro 31.

**Figura 20.** Superficie de respuesta para grado de hidrólisis.

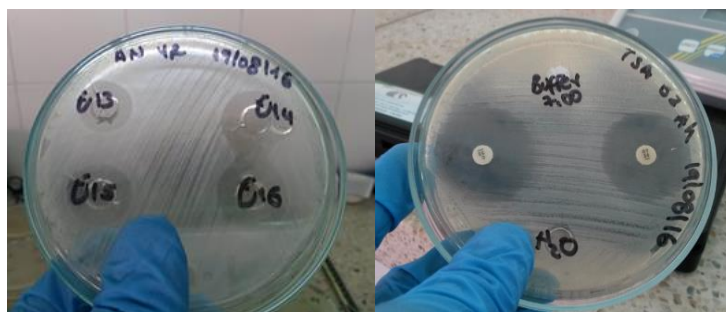




## 5.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA (AAM)

El mecanismo de acción de los péptidos antibacterianos no es claro hasta el momento, sin embargo existen referencias que describen interacciones entre las péptidos activos y la bicapa lipídica de la membrana bacteriana, permitiendo el aumento en la permeabilidad de la membrana, además algunos péptidos activos pueden inducir lisis completa por medio de la formación de poros en la membrana, generando una inestabilidad de esta por desplazamiento lipídico, o bien bloqueando el gradiente iónico (Wieprecht *et al.*, 1997; Yeaman *et al.*, 2007), para ello los péptidos antibacterianos poseen algunas características importantes, como es su composición y tamaño. Lo que está directamente relacionado con el grado de hidrólisis, los resultados obtenidos muestran que a un tiempo de hidrólisis de 25 y 50 minutos se obtienen grados de hidrólisis del 11 y 19 % respectivamente, los hidrolizados que presentaron estas características inhibieron el crecimiento parcial de *Aeromonas hydrophila*, generando halos de inhibición como se observa en la Figura 21, Los intervalos de tiempo, grados de hidrólisis y diámetro de halos de inhibición se muestran en el Cuadro 32.

**Figura 21.** Halos de inhibición generados por la AAM de péptidos.



Fuente: Gaviria (2017)

Un estudio similar llevado a cabo por Wald, *et al.* (2016), quienes hidrolizaron subproductos de trucha arcoíris, por vía enzimática usando pepsinas extraídas de los estómagos presentes en las vísceras de esta misma especie (Wald, Rehbein, *et al.*, 2016), obtuvieron actividad antimicrobiana de sus hidrolizados en un rango de GH del 11 al 30%, encontrando inhibición de cepas patógenas Gram negativas y positivas, dentro de las que se encuentran *Flavobacterium psychrophilum*, *salmoninarum Renibacterium*, *Aeromonas salmonicida*, *E. coli*, *M. luteus* y *Enterococcus faecalis*, al comparar los resultados obtenidos por Wald *et al.*, (2016), con los de esta investigación se observa que los grados de hidrólisis son similares y se encuentran dentro del rango reportado en literatura que muestra capacidad



antimicrobiana, además la inhibición se presentó frente a *Aeromonas hydrophila*, bacteria del grupo gran negativo al igual que algunas evaluadas por Wald *et al.*, (2016) (Wald, Schwarz, *et al.*, 2016). Otros estudios en los que se hidrolizaron subproductos de tilapia (*Oreochromis niloticus*), mostraron actividad antimicrobiana frente *Yersinia ruckeri* con un grado de hidrólisis del 22,1 % (Robert *et al.*, 2015), 2 unidades por encima de lo reportado en esta investigación. Subproductos de *Scomber scombrus* se hidrolizaron enzimáticamente, los hidrolizados mostraron inhibición del crecimiento de *Listeria innocua* y *Escherichia coli*, (Ennaas *et al.*, 2015b), la enzima usada en este reporte es la misma que se usó en esta investigación, por lo cual con protamex muestra la capacidad de generar péptidos activos a partir del fraccionamiento de proteínas de manera endo y exo. A partir de lo reportado en literatura y obtenido en esta investigación, se puede pensar que la actividad antimicrobiana de péptidos obtenidos a partir de subproductos de trucha arcoíris, está directamente relacionada con el tamaño de los péptidos, y a un más con la composición de aminoácidos y su estructura, siendo menos relevante la enzima utilizada en la hidrólisis enzimática.

**Cuadro 32.** Capacidad antimicrobiana de péptidos.

Muestra	GH	Diámetro de inhibición (cm)					
		<i>Aeromonas hydrophila</i>			<i>Streptococcus agalactiae</i>		
0	0	0	0	0	0	0	0
25	11	0,2	0,3	0,1	0	0	0
50	19	1,3	1,2	1,2	0	0	0
75	25	0	0	0	0	0	0
100	31	0	0	0	0	0	0
125	37	0	0	0	0	0	0
150	47	0	0	0	0	0	0
175	52	0	0	0	0	0	0
200	57	0	0	0	0	0	0
230	56	0	0	0	0	0	0
Buffer		0	0	0	0	0	0
Agua		0	0	0	0	0	0
OT		23,9	23,7	24,9	28,4	29,2	29,3
C					30,9	31,1	31,3
AMP		23,0	22,1	23,8			

Fuente: Gaviria (2017)

En el Cuadro 33, se muestra el contenido de aminoácidos de trucha arcoíris obtenido en esta investigación, algunos reportes indican que un contenido importante de varios aminoácidos tales como asparagina, glutamina, lisina, leucina, glicina, Fenilalanina, y la prolina se han identificado en péptidos con actividad

antibacteriana aislada de varios subproductos de los peces (Beaulieu *et al.*, 2015; Robert *et al.*, 2015); (Beaulieu, Thibodeau, Bonnet, Bryl, & Carbonneau, 2013), estos aminoácidos representan el 50 % de la proteína de vísceras de trucha arcoíris, por lo cual explica la obtención de péptidos antimicrobianos a partir de estos subproductos, otros autores obtuvieron péptidos activos con capacidad antibacterial que presentaban en su estructura confidencialmente un alto contenido de prolina, glicina, además de cisteína e histidina, la mayoría de péptidos antibacterianos reportados mostraron actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y levadura (Dolashka *et al.*, 2011), lo cual es positivo para futuras investigaciones usando como sustrato los subproductos de trucha arcoíris, por otro lado se sabe que algunos aminoácidos, como la lisina y la arginina, interactúan fuertemente con grupos fosfato en bicapas lipídicas a través de fuerzas electrostáticas generando daño a la membrana celular, cuando se analiza el contenido obtenido en el presente estudio se observa que lisina y arginina se encuentran dentro aminoácidos mayoritarios, con porcentajes de 8,10 % y 10,16 % respectivamente, lo cual genera una posible ruta de acción de la capacidad antimicrobiana de los péptidos obtenidos (Afonin *et al.*, 2014; Bessalle, Kapitkovsky, Gorea, Shalit, & Fridkin, 1990) El contenido de aminoácidos hidrofílicos como hidrofóbicos es balanceado dan lugar a la obtención de péptidos con propiedades anfipáticas, las cuales pueden interactuar con sitios apolares y polares sobre y dentro de la membrana celular logrando la generación de poros, lo cual causa daño a la membrana celular modelo propuesto para la capacidad antimicrobiana (Ageitos, Sánchez-Pérez, Calo-Mata, & Villa), este porcentaje coincide por lo encontrado por Wald *et al.*, (2016) (Wald, Schwarz, *et al.*, 2016). El contenido de aminoácidos hidrofóbicos es del 43,41 % en las proteínas de vísceras de trucha, valor importante debido a que estos generan hidrofobicidad en péptidos, algunas investigaciones sugieren el que el aumento de la hidrofobicidad de un péptido genera una mayor permeabilidad en la membrana celular (Wieprecht, Apostolov, & Seelig, 2000).

**Cuadro 33.** Distribución del porcentaje de aminoácidos de vísceras de trucha.

<b>Aminoácidos hidrofóbicos</b>	<b>% Aminoácidos</b>
Isoleucina	4,9
Leucina	7,8
Metionina	3,0
Fenilalanina	4,5
Valina	5,9
Alanina	5,4
Triptófano	0,6
prolina	4,5
<b>Total</b>	<b>36,6</b>
<b>Aminoácidos Básicos</b>	
Lisina	8,4
Arginina	10,2
Histidina	2,3
<b>Total</b>	
<b>Aminoácidos polares</b>	
Tirosina	3,5
Treonina	3,3
Glicina	7,8
Serina	11,3
<b>Total</b>	
Ácido aspártico	3,8
Ácido glutámico	12,9

Fuente: Gaviria (2017)

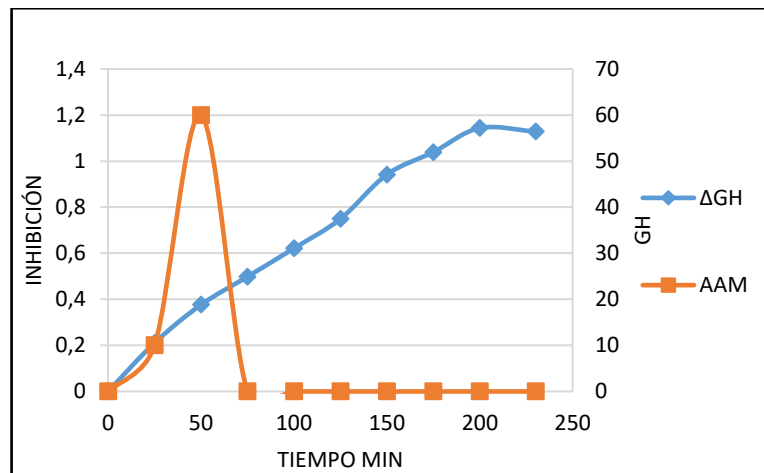
Dentro de las generalidades propuestas para la mayoría de los péptidos antibacterianos se encuentran: ser catiónicos, lo cual es muy importante para la atracción electrostática entre péptidos y membranas de fosfolípidos cargadas negativamente debido a la presencia de lípidos aniónicos, tales como fosfatidilglicerol, cardiolipina o lipopolisacáridos (Teixeira, Feio, & Bastos, 2012), lo cual explica la especificidad de los péptidos por las membranas bacterianas, esto debido a que la membrana bacteriana, en contraste con la membrana de células de mamíferos contiene moléculas aniónicas que están orientadas hacia el exterior de la célula (fosfolípidos), por lo que péptidos catiónicos se unen preferentemente a las membranas bacterianas cargadas negativamente, pero no a la membrana plasmática anfíplica de los mamíferos (Meikle *et al.*, 2017), en este sentido existen residuos de aminoácido capaces de generar péptidos catiónicos, dentro de los que se encuentran lisina arginina y tirosina, el contenido de estos aminoácidos es del 8,40 %, 10,16 % y 3,46 %, lo que equivale a un 22 % del total de la proteína de

vísceras de trucha, estos residuos de aminoácidos a condiciones de pH fisiológico tendrían una carga neta de +1, generando fracciones proteicas catiónicas capaces de interactuar con moléculas aniónicas presentes en las membrana celular bacteriana como ya se mencionó, lo cual supone otra ruta de acción de los péptidos encontrados en este estudio (Pane *et al.*, 2017).

### 5.6.1. Seguimiento de actividad antimicrobiana y diseño experimental

En la Figura 22, el comportamiento obtenido del grado de hidrólisis y los halos de inhibición (cm) para *Aeromonas hydrophila* en el tiempo, a diferencia de la capacidad antioxidante, la actividad antimicrobiana solo se observó en un corto rango de grado de hidrólisis.

**Figura 22.** AAM/GH Vs tiempo.



Fuente: Gaviria (2017)

Los hidrolizados obtenidos a partir del diseño experimental planteado se muestra en el Cuadro 34, con lo cual se corrobora que solo se presenta inhibición sobre *Aeromonas hydrophila*, a un GH entre 11 y 20 %, para ninguna de las unidades experimentales se observó inhibición en el crecimiento de *Streptococcus agalactiae*, este es un patógeno emergente de los peces y es fatal para tilapias todo el mundo, la no inhibición del crecimiento de esta cepa, se puede deber a que esta cepa se prolifera rápidamente, incluso dentro del pez, lo que lo ha convertido en un patógeno altamente agresivo, se ha descubierto que este puede invadir fácilmente el bazo del pez en la fase temprana de la infección, y luego replicar eficazmente en el cerebro

y los ojos, lo que lo hace mortal para los animales (Su *et al.*, 2017), además este microorganismo está clasificado como Gram positivo, el cual tiene una morfología diferente en la membrana celular de las Gram negativas dentro de las que está la *Aeromonas hydrophila*, las cuales está compuesta por varias capas entre fosfolípidos y proteínas, lo cual la puede hacer permeable a la acción de péptidos activos, mientras que las Gram positivas esta formadas por un solo tipo de moléculas (peptidoglicanos) con un ancho superior las bacterias Gram negativas, representando un 90 % de la pared celular, lo cual lo hace más rígido y resistente a la presencia de compuestos que puedan afecten su estructura. (Madigan, Martinko, & Brock, 2006; Malanovic & Lohner, 2016). Tanto la rapidez en la proliferación del *Streptococcus agalactiae*, como su morfología, podrían ser la causa de la no inhibición del crecimiento por parte de péptidos obtenidos de la hidrólisis enzima de proteínas de vísceras de trucha arcoíris.

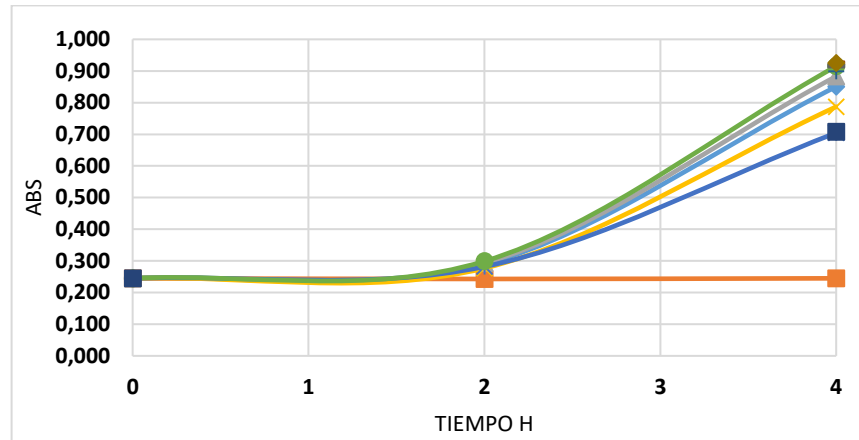
**Cuadro 34.** Diseño experimental para AAM.

Corrida	Bloque	Tiempo (h)	E/S	GH	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
1	1	1,0	3,0	17	√	X
2	1	2,0	9,0	45	X	X
3	1	3,0	8,0	55	X	X
4	1	1,0	8,0	35	X	X
5	1	3,0	3,0	49	X	X
6	1	2,0	2,0	37	X	X
7	1	0,59	5,5	2	X	X
8	1	2,0	5,5	46	X	X
9	1	2,0	5,5	46	X	X
10	1	3,4	5,5	56	X	X

Fuente: Gaviria (2017). √: Inhibición positiva-X: Inhibición negativa

Además de la metodología planteada por halo de inhibición, se llevó a cabo el seguimiento de las unidades experimentales por caldo de cultivo midiendo la transmitancia de la muestra, los resultados se expresan en unidades de absorbancia en la Figura 23, en la cual se observa el crecimiento de la *Aeromonas hydrophila*, de una Abs de 0,245 hasta 0,851 en un tiempo de 4 horas, sin embargo el hidrolizado correspondiente a la corrida 1, con un GH de 17 %, inhibió el crecimiento de la bacteria, sin embargo aquellos que presentaron grados de hidrólisis elevados aceleraron la proliferación del microorganismo, esto se debe posiblemente a un elevado contenido en aminoácidos libres que la *Aeromona* toma como fuente de carbono y nitrógeno.

**Figura 23.** Seguimiento de AAM por turbidimetría.



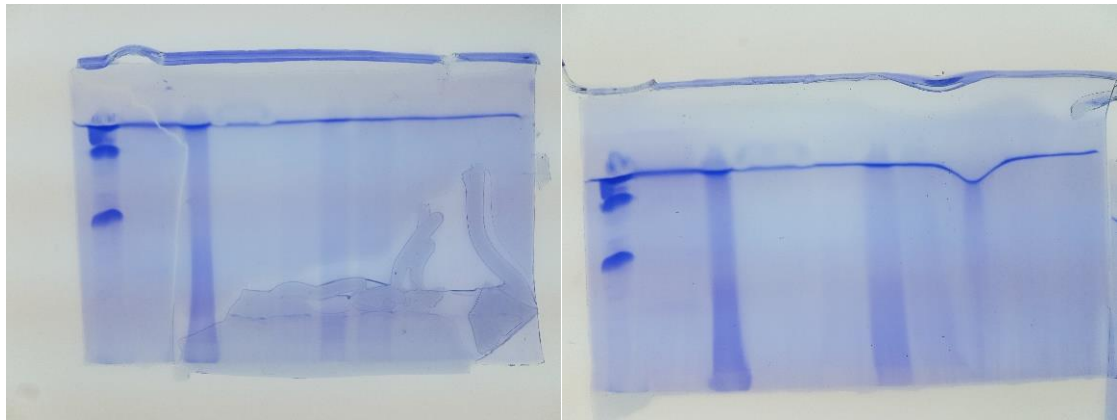
Las líneas corresponden: Aero 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10  
Fuente: Gaviria (2017).

## 5.7. DETERMINACIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES DE PÉPTIDOS POR ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las proteínas están estrechamente ligadas a los aminoácidos que las componen, cada uno de ellos presenta un grupo R, con características particulares, como los son ser: hidrofóbicos, hidrofílicos, ionizables o no ionizables. El ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, arginina y lisina, pueden aportar carga dependiendo del pH en el que se encuentren. Esta propiedad hace que proteínas de diferente peso molecular difieran en su carga neta, lo cual ha sido aprovechado para la caracterización de proteínas por la técnica conocida como electroforesis, la cual se basa en un diferencial de migración de especies cargadas en un campo eléctrico.

Esta técnica ha sido ampliamente usada en la caracterización de hidrolizados y péptidos activos de subproductos piscícola, debido a que no solo genera una composición en pesos moleculares, sino que también se ha usado para aislar y purificar péptidos de interés, estudios realizados por Roslan *et al.*, (2014), sobre subproductos piscícolas mostraron bandas con actividad biológica por debajo de 3,5 kDa (Roslan *et al.*, 2014).

**Figura 24.** Electroforesis.



Fuente: Gaviria (2017)

Las propiedades fisicoquímicas y estructurales de las proteínas están estrechamente ligadas a los aminoácidos que las componen, cada uno de ellos presenta un grupo R, con características particulares, como los son ser: hidrofóbicos, hidrofílicos, ionizables o no ionizables. El ácido aspártico, ácido glutámico, histidina, arginina y lisina, pueden aportar carga dependiendo del pH en el que se encuentren. Esta propiedad hace que proteínas de diferente peso molecular difieran en su carga neta, lo cual ha sido aprovechado para la caracterización de proteínas por la técnica conocida como electroforesis, la cual se basa en un diferencial de migración de especies cargadas en un campo eléctrico.

Esta técnica ha sido ampliamente usada en la caracterización de hidrolizados y péptidos activos de subproductos piscícola, debido a que no solo genera una composición en pesos moleculares, sino que también se ha usado para aislar y purificar péptidos de interés, estudios realizados por Roslan *et al.*, (2014), sobre subproductos piscícolas mostraron bandas con actividad biológica por debajo de 3,5 kDa (Roslan *et al.*, 2014).

En la Figura 24, se observan los resultados obtenidos de las corridas de electroforesis se observan bandas sin marcas contundentes o bien con poca resolución esto se puede deber a la alta presencia de péptidos de bajo peso molecular. Bhaskar *et al.* (2008), optimizó la hidrólisis enzimática de vísceras de *Catla catla*, la caracterización de los productos obtenidos mostró que se componen por péptidos con pesos moleculares por debajo de 8 kDa, con un grado de hidrólisis cercano al 50 %, en este rango de pesos este investigador no obtuvo buena separación y resolución en las bandas marcadas, sin embargo la literatura nos muestra que la mayoría de hidrolizados de subproductos piscícolas obtenidos vía

enzimática con grados de hidrólisis mayores al 20 % su contenido en péptidos en rango de masa entre 0-500 Da es del 17 % (Bhaskar *et al.*, 2008), en los cuales se presume la presencia de compuestos antioxidantes, con cadenas entre dos a 5 aminoácidos, con un porcentaje del 11,20 % péptidos entre 500 a 1000 daltons, con un valor aproximado de 9 residuos de aminoácidos en la cadena, lo cual genera un idea de lo obtenido en los hidrolizados obtenidos en esta investigación (Robert *et al.*, 2015).

## **5.8. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE PÉPTIDOS ACTIVOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A MASAS**

Una de las características más importantes de cromatografía líquida acoplada a masas es su exactitud, lo que hace una técnica confiable a la hora de identificar y cuantificar analitos, sin embargo, al tratarse de dos equipos en tándem, se hizo necesario estimar los mejores parámetros para el análisis de péptidos obtenidos de la hidrólisis de proteínas presentes en vísceras de trucha, en este sentido se realizaron los primeros ajustes en el detector de masas Exactive Plus Orbitrap®, exactamente sobre la fuente de ionización HESI.

### **5.8.1. Parámetros de análisis para fuente de ionización HESI y detector Orbitrap®**

Para este análisis se usó como respuesta tres parámetros importantes en este tipo de análisis, el primero es % ACG Target, la cual me determina el porcentaje de moléculas en la C-trap, este valor debe estar por encima del 12 % encontrando la mejor respuesta a un valor de gas envolvente de 30 mL/min, otro importante valor es la corriente iónica total o TIC, el cual no puede variar por encima de 10, por último, la señal NL, la cual se considera buena por encima de una valor igual o mayor 1,00E+05.

Uno de los primeros parámetros fue el gas envolvente el cual se encarga de generar el spray para que la muestra pueda ser transportada y ionizada, el equipo maneja un rango entre 0 hasta 80 mL/min, los mejores valores para % ACG, % TIC y NL fueron obtenidos a un valor de 30.



**Cuadro 35.** Valores de Gas envolvente para la HESI.

Gas Envolvente	% ACG Target	% TIC	NL
10	13	2	6,00E+01
30	71	4	3,00E+06
60	29	3	1,00E+06

Fuente: Gaviria (2017)

El detector de masas Orbitrap dentro de sus múltiples sistemas electrónicos tiene un primer filtro y acelerador de masas, el cual consiste en un juego de lentes conocidos como S-lens, el mejor valor encontrado para este parámetro fue de 70.

**Cuadro 36.** Valores de S-Lens para el Orbitrap.

S-Lens	% ACG Target	% TIC	NL
50	35	5	2,00E+06
60	38	5	2,00E+06
70	41	3	2,00E+06
80	35	5	1,00E+06

Fuente: Gaviria (2017)

Uno de los factores más importantes es el voltaje del spray, el cual genera la ionización de los analitos, en este caso se obtuvo el mejor valor para las diferentes respuestas a un valor de 6 KW.

**Cuadro 37.** Valores de voltaje de spray para la HESI.

Voltaje Spray	% ACG Target	% TIC	NL
1	1	205	nd
2	1	85	nd
3	1	82	nd
4	39	1	2,00E+06
5	29	2	1,00E+06
6	41	2	1,00E+06

Fuente: Gaviria (2017)

Como ya se mencionó la fuente de ionización H-ESI se caracteriza por tener la capacidad de variar la temperatura esto lo hace calentando el gas auxiliar, el cual se convierte en otro parámetro, se determinó que, a 190 °C, se encontró la mejor señal valor de ACG y poca variación del TIC.

**Cuadro 38.** Valores de la temperatura del gas auxiliar.

Temperatura gas aux	% ACG Target	% TIC	NL
150	74	7	1,00E+06
170	70	4	1,00E+06
190	99	1	2,00E+06
200	97	2	2,00E+06
220	82	1	2,00E+06
300	91	2	2,00E+06
320	85	1	2,00E+06

Fuente: Gaviria (2017)

Otra de las temperaturas a establecer es la temperatura del tubo de transferencia termina ITT, por el cuál las moléculas indizadas entran al detector de masas, la mejor temperatura fue de 140 °C, esta temperatura es acorde con el tipo de moléculas que se están analizando debido a que los péptidos pueden ser desnaturalizados a temperaturas mayores.

**Cuadro 39.** Valores de temperatura del ITT.

Temperatura ITT	% ACG Target	% TIC	NL
100	73	9	1,00E+06
120	74	8	1,00E+06
140	80	2	2,00E+06
160	76	1	2,00E+06

Fuente: Gaviria (2017)

### 5.8.2. Condiciones cromatográficas

Las condiciones de cromatografía se llevaron a cabo bajo los parámetros establecidos por Toopcham et al., (2015) y Liu (2014) con algunas variaciones, estos investigadores desarrollaron un método sensible, preciso y robusto de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para identificar perfiles de péptidos, a pesar de que la matriz es diferente se tomaron como base los parámetros de fase móvil (S. Liu & Liu, 2014; Toopcham *et al.*, 2015).

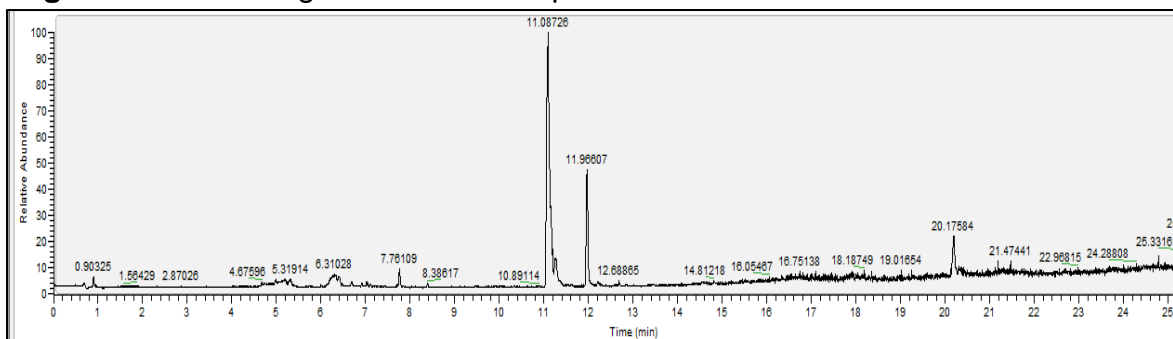
Xu *et al.*, (2016), purifico e identifico péptidos inhibidores de ECA, usando la misma referencia de UHPLC (Dionex ultimate 3000), al igual que en esta investigación la fase estacionaria estaba dada por una columna C18 (Promosil C18, 4,6 x 250 mm), y la fase móvil se constituía por un gradiente lineal de acetonitrilo y agua

desionizada (Xu *et al.*, 2016), los parámetros finales obtenidos en esta investigación son: fase móvil constituida por (A) Agua (0,1% Ácido fórmico)–(B) Acetonitrilo (0,1% Ácido fórmico, flujo: 300 µL/min, 5 minutos para equilibrar la columna, luego un gradiente con una duración de 8 min de 20% a 100% (B), u tiempo constante en de 5 min y un retorno de 5 min, el compartimiento de columna se mantuvo a una temperatura de 30 °C.

### 5.8.3. Pesos moleculares de péptidos activos en hidrolizados proteicos de subproductos de trucha

En la Figura 25 se muestra el cromatograma obtenido del análisis de pesos moleculares de la proteína nativa (aislado proteico), en el cual se observan aproximadamente 7 señales, en un rango se masa de 1.000 hasta 1.900 m/z aproximadamente, lo cual es lógico debido a que esta proteína no ha sido sometida a ningún proceso de hidrólisis, se debe tener en cuenta que el rango de masas es de 800 a 3.000 m/z, debido a que en rangos más bajos no se encontraron resultados, al realizar el análisis por encima de 3.000 m/z no se registraron señales, esto se puede deber a que proteínas nativas de origen piscícola su peso molecular se encuentra por encima de los 5.500 kDa (Chang *et al.*, 2017; Chi, Wang, Hu, *et al.*, 2015), lo cual no las hace detectables con esta técnica, sin embargo la poca cantidad masas moleculares de proteínas registradas en el Cuadro 40, nos indican que la proteína nativa no ha sufrido procesos de hidrólisis, o bien que ha sido degradada por descomposición microbiana, debido a que este efecto aumentaría las moléculas encontradas a bajos pesos moleculares.

**Figura 25.** Cromatograma de aislado proteico.



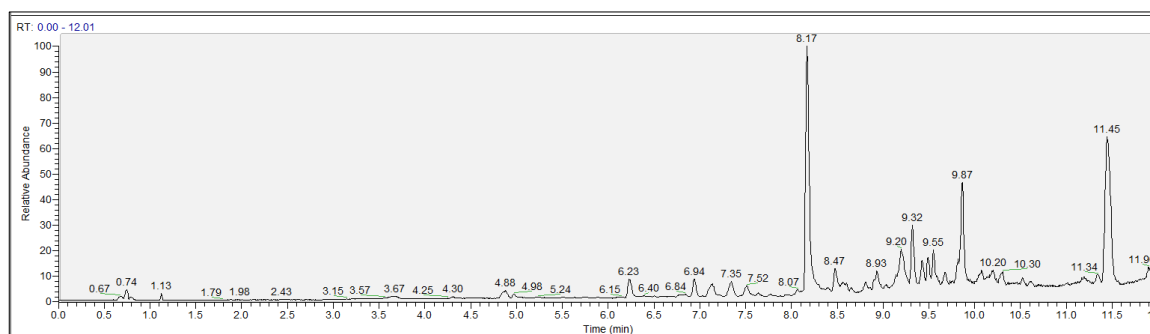
Fuente: Gaviria (2017)

**Cuadro 40.** Tiempos de retención y masas moleculares en aislado proteico.

Aislado Proteico		
	Tiempo de retención (min)	Peso molecular (m/z)
800-3000 m/z	0,90325	1.023,37140
	6,31028	1.391,52698
	7,76109	1.182,46997
	11,08726	1.472,21770
	11,96607	1.440,19437
	20,17840	1.852,97693
	25,44749	1.877,94348

El análisis cromatográfico del hidrolizado con capacidad antioxidante se muestra en la Figura 26, en este se observan picos correspondientes a péptidos en un rango de masa de 100 a 1.200 m/z, este hidrolizado presenta un grado de hidrólisis aproximado del 57 %, logrando encontrar péptidos de bajo peso molecular.

**Figura 26.** Cromatograma hidrolizado capacidad antioxidante.



Fuente: Gaviria (2017)

Los pesos moleculares correspondientes a los picos del cromatograma se reportan en el Cuadro 41, se determinaron aproximadamente 15 masas moleculares  $[M+H]^+$  correspondientes al hidrolizado que presento mejor actividad antioxidante, de acuerdo a lo encontrado se puede pensar que estos péptidos están compuestos entre dos a 11 aminoácidos, lo que equivale a aproximadamente a péptidos menores de 1.200 Da, lo cual concuerda con lo encontrado por Morales y Medina (2016), quienes reportan péptidos con capacidad antioxidante a partir de proteína piscícola con pesos por debajo de los 2.500 Da (Morales-Medina *et al.*, 2016), Ketnawa *et al.*, (2016) hidrolizo proteínas de bagre encontrando péptidos antioxidantes por debajo de 1.700 Da, cuando uso proteasas alcalinas, (Ketnawa *et*

*al.*, 2016). Un importante análisis llevado a cabo por Borawska *et al.*, (2016), en el cual evaluaron la capacidad antioxidante de péptidos de proteínas de carpa con buenos resultados, los análisis de masas encontrados el péptido activo tuvo una masa molecular de  $m/z=535$ , valor que se encuentra dentro del rango de masas encontradas en este trabajo (Borawska *et al.*, 2016), hidrolizados de anchoa mostraron péptidos antioxidantes, los cuales fueron aislado y purificados, los pesos moleculares de los seis péptidos fueron 771,35 Da, 741,33 Da, 901,45 Da, 1.233,63 Da, 872,37 Da y 1.171,60 Da, el rango de masas fue entre  $m/z$ : 300-1.800, muy similar que lo encontrado en esta investigación. Como se muestra en la literatura y lo obtenido en esta investigación los péptidos antioxidantes se encuentran en un rango entre 300 Da a 1000 Da, además que su estructura debe estar entre 2 a 10 aminoácidos lo que permite mecanismos de absorción de radicales. Un importante estudio llevado a cabo por Jiang *et al.*, 2014, caracterizó péptidos antioxidante, obtenidos a partir de la hidrólisis de proteína de *Decapterus maruadsi*, la caracterización de masas moleculares determinaron que las secuencias Su-Asp-His-Pro-Val-Cys (HDHPVC) y Su-Glu-Lys-Val-Cys (HEKVC), tenían la mayor capacidad antioxidante, la masa molecular teórica de HDHPVC se determinó como 706,8 Da, la cual es muy similar que la encontrada en esta investigación con una masa molecular de 704,5  $[M+H]^+$ , lo que abre una posibilidad a la razón por la cual los hidrolizados presentan capacidad antioxidante, debido a la presencia de histidina y prolina en la secuencia propuesta en la literatura (Jiang *et al.*, 2014).

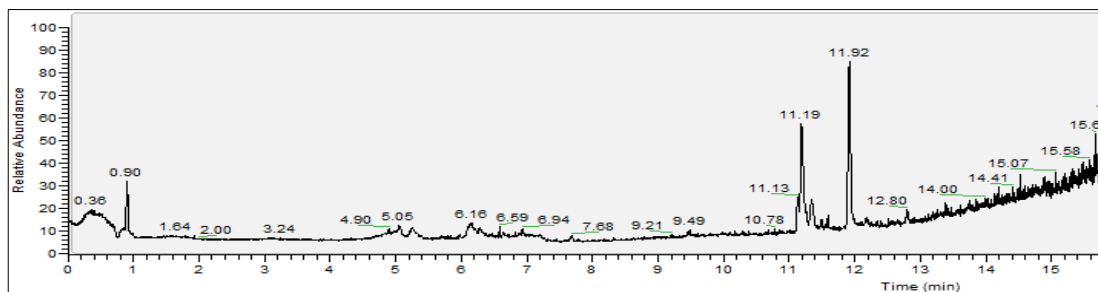
**Cuadro 41.** Tiempos de retención y masas moleculares de péptidos con CA.

Capacidad Antioxidante		
Tiempo de retención (min)	Masa molecular (m/z)	
100- 1250 m/z	0,74407	245,07864
	1,12578	367,06985
	4,87686	229,06862
	6,23358	459,14789
	6,94196	387,13159
	7,13309	704,49506
	7,51005	391,28519
	8,17390	651,32971
	8,47969	274,27478
	9,19623	633,30426
	9,32192	579,29041
	9,54712	595,26788
	9,67353	331,16769
	9,86271	395,41879
11,44717	1.209,79529	

Fuente: Gaviria (2017)

El cromatograma del hidrolizado que presento capacidad antimicrobiana se muestra en la Figura 27, este presenta una cantidad menor de picos con respecto al hidrolizados con CA, esto probablemente está relacionado con el grado de hidrólisis. La capacidad antioxidante se obtuvo con un 57 % de GH, mientras que con un GH de 20 se mostró la AAM, lo cual implican péptidos de cadena más larga, y menos fracciones de péptidos de péptidos de cadena corta, que son identificados en el rango de masa analizada.

**Figura 27.** Cromatograma hidrolizado actividad antimicrobiana.



Fuente: Gaviria (2017)

En el Cuadro 42, se encuentran las masas moleculares del hidrolizado con capacidad antioxidante, estos están en un rango de masas de 230 a 850 m/z aproximadamente, lo que equivale a cadenas de dos hasta 8 aminoácidos aproximadamente, siendo los de cadena más larga los que presentan mayor capacidad antimicrobiana de acuerdo a lo analizado anteriormente, al comparar los resultados obtenidos con lo reportado en la literatura, encontramos que Robert *et al.*, (2015), evaluó la actividad antimicrobiana de hidrolizados de subproductos piscícolas, encontró que con un GH del 21 %, los péptidos mostraron actividad antimicrobiana contra *Yersinia ruckeri* y en menor medida contra *Edwardsiella tarda*, la caracterización por masas moleculares mostró que el hidrolizado contenía 1.374 fracciones de proteína, en un rango de masas de 500 a 5.000 Da, esta cantidad elevada de compuestos hizo imposible la caracterización de los compuestos activos (Robert *et al.*, 2015), péptidos antimicrobianos fueron obtenidos a partir de la hidrólisis de proteínas de *Scomber scombrus* usando protamex, encontrando péptidos capaces de inhibir parcialmente y total el crecimiento de bacterias Gram positivas Gram-positivo (*Listeria innocua*) y Gram-negativas (*Escherichia coli*), los péptidos fueron identificados como SIFIQRFTT, RKSGDPLGR, AKPGDGAGSGPR y GLPGPLGPAGPK, con masa molecular por debajo de 1.200 Da, lo cual es similar a lo encontrado en esta investigación, (Ennaas *et al.*, 2015b), este investigador también evaluó la hidrólisis de subproductos de *Scomber scombrus*, con otro tipo

de enzimas comerciales, encontrando que péptidos obtenidos con Protamex, Neutrase y papaína generaron un gran número de péptidos pequeños los cuales están en un rango de masas entre 300 a 700 Da y presentaron inhibición al crecimiento de *Listeria innocua* y *Escherichia coli*, este rango coincide con 6 de los cinco péptidos encontrados en esta investigación los cuales tienen masas de 390,27558, 278,00773, 632,61954, 764,02127 y 849,06003 Da (Ennaas, Hammami, Beaulieu, & Fliss, 2015a), dando posibilidad a que la actividad antimicrobiana se encuentre en alguno de estos compuestos, además Wald *et al.*, (2016) quien hidrolizó subproductos de trucha arcoíris determinó que péptidos con una masa molecular por debajo de 3 kDa presentan actividad antimicrobiana con un GH del 30 (Wald, Schwarz, *et al.*, 2016).

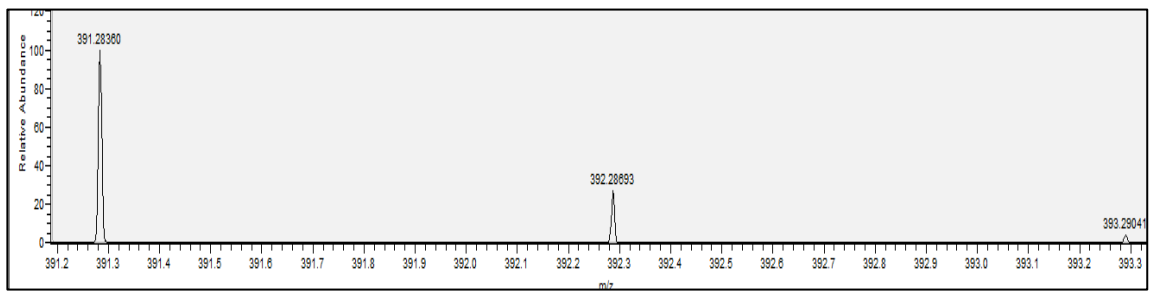
**Cuadro 42.** Tiempos de retención y masas moleculares de péptidos con AAM.

	Actividad Antimicrobiana	
	Tiempo de retención (min)	Masa molecular (m/z)
100- 1250 m/z	0,90262	232,97951
	5,05933	391,28360
	5,05933	279,01563
	6,14412	633,62744
	11,19410	765,02917
	11,91716	850,06793

Fuente: Gaviria (2017)

La ionización por electrospray ESI o HESI para este caso debido a que el proceso se puede llevar a través de una sonda capaz de controlar temperatura, a logrando mejorar la sensibilidad del método, este tipo de ionización consiste en pasarla muestra a través de un capilar al cual se le aplica un alto potencial eléctrico (voltaje de spray), a la salida del capilar la solución se dispersa en forma de spray formado por pequeñas gotas cargadas. En el caso de las proteínas y péptidos, los iones generados pueden estar protonados de forma múltiple dando lugar a diferentes especies para una misma molécula, el extremo N-terminal y los residuos de histidina, arginina y lisina son los candidatos a protonarse, un ejemplo claro se muestra en la Figura 28, donde se observa la masa molecular de un péptido presente en el hidrolizado con actividad antimicrobiana, al cual le corresponde un tiempo de retención de 5,05933 minutos, en el cual se observan tres señales del mismo péptido, pero con una diferencia en masa correspondiente a un protón más para cada caso.

**Figura 28.** Masa molecular de péptido presente en hidrolizado con AAM.



Fuente: Gaviria (2017)



## 6. CONCLUSIONES

- Los subproductos piscícolas obtenidos a partir de la producción de trucha arcoíris, mostraron un importante contenido en moléculas como lípidos y proteínas, la cual está compuesta por un porcentaje balanceado de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, conveniente a la hora de obtener péptidos con actividad antimicrobiana, además de un contenido considerable de residuos de aminoácidos catiónicos a pH neutro, responsables de dicha capacidad.
- la presencia de en de enzimas proteolíticas y microorganismos presentes en vísceras de trucha arcoíris mostraron ser termolábiles, su actividad y presencia fueron eliminados cuando se sometieron a temperaturas de 65 °C por 15 minutos, con lo cual se garantizó un material inocuo para la obtención de péptidos activos
- La hidrólisis enzimática es una de las vías más convenientes para aprovechar el valor nutricional y funcional de las proteínas presentes en vísceras de trucha arcoíris, productos con alto contenido de aminoácidos esenciales y bioactividad se obtuvieron medio de este proceso, el modelo matemático obtenido por medio del diseño experimental planteado, permitió controlar factores como el tiempo, la concentración de enzima y temperatura, para la obtención de péptidos antimicrobianos y antioxidantes a partir de vísceras de trucha arcoíris, además de lograr un grado de hidrólisis del 57 %, valor superior a lo reportado en la literatura.
- Se determinó que la capacidad antioxidante de péptidos obtenidos a partir de la hidrólisis enzimática de proteínas de trucha arcoíris, tiene una relación directa con el grado de hidrólisis, logrando obtener porcentajes de absorción de radicales del 40 y 43 % para los métodos DPPH y ABTS.
- Los péptidos obtenidos de la hidrólisis enzimática de proteínas de trucha arcoíris, mostraron inhibición al crecimiento de *Aeromonas hydrophila*, con un grado de hidrólisis del 19 %, lo que indica una estrecha relación entre el tamaño de los péptidos y su capacidad antimicrobiana.
- *Streptococcus agalactiae* no fue inhibido por ningún de los péptidos en un amplio rango de grado de hidrólisis, posiblemente se deba a la interacción de

los péptidos antimicrobianos con peptidoglicano, lo cual no genera un efecto perturbado sobre la membrana celular, mientras que la interacción con los ácidos aniónicos de bacterias Gram positivas puede inestabilizar este grupo de bacteria y así reducir su crecimiento.

- La caracterización por espectrometría de masas permitió la identificación de masas moleculares de los péptidos presentes en hidrolizado con capacidad antioxidante, destacando la presencia de 704,5 [M+H]<sup>+</sup>, como el péptido que presenta mayor similitud a lo encontrado en la literatura.
- El hidrolizado con actividad antimicrobiana mostró una cantidad menor de masas moleculares que el hidrolizado con capacidad antioxidante, lo cual está relacionado directamente con el grado de hidrólisis.

## 7. RECOMENDACIONES

Este trabajo se presenta como el inicio de la investigación para la obtención de compuestos bioactivos a partir de subproductos piscícolas, con el cual se obtuvieron resultados significativos, sin embargo, para continuar en esta línea se recomienda:

- Realizar la reacción de hidrólisis evaluando otro tipo de enzimas proteolíticas, con el fin de analizar la incidencia de la enzima sobre los compuestos activos.
- Llevar a cabo análisis de capacidad antioxidante por métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno como ORAC y TRAP.
- Evaluar otro tipo de actividades en péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática de subproductos, como inhibidores de ECA, anticáncer, antiestrés, entre otros, a partir del modelo de hidrólisis enzimático obtenido en este trabajo.
- Utilizar técnicas como cromatografía preparativa o ultra filtración para aislar e identificar la fracción peptídica encargada de la actividad.
- Determinar el valor MIC, el cual se define la concentración más baja de un agente antimicrobiano que inhibe el 100 % del crecimiento de un microorganismo
- Evaluar la inclusión de péptidos activos en alimentación de especies menores.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Nissen, J., & Olsen, H. S. (1982). TASTE AND TASTE EVALUATION OF SOY PROTEIN HYDROLYZATES. In G. C. Inglett (Ed.), *Chemistry of Foods and Beverages: Recent Developments* (pp. 149-169): Academic Press.
- Afonin, S., Glaser, R. W., Sachse, C., Salgado, J., Wadhvani, P., & Ulrich, A. S. (2014). 19F NMR screening of unrelated antimicrobial peptides shows that membrane interactions are largely governed by lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(9), 2260-2268. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.03.017>
- Ageitos, J. M., Sánchez-Pérez, A., Calo-Mata, P., & Villa, T. G. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochemical Pharmacology*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.018>
- Akagündüz, Y., Mosquera, M., Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2014). Sea bream bones and scales as a source of gelatin and ACE inhibitory peptides. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 579-585. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.026>
- Barzyk, W., Campagna, S., Więclaw, K., Korchowiec, B., & Rogalska, E. (2009). The affinity of two antimicrobial peptides derived from bovine milk proteins for model lipid membranes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 343(1-3), 104-110. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.01.036>
- Batista, I. (1999). Recovery of proteins from fish waste products by alkaline extraction. *European Food Research and Technology*, 210(2), 84-89. doi: 10.1007/s002170050539
- Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N. M., & Nunes, M. L. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*, 45(1), 18-24. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2009.07.019>
- Beaulieu, L., Bondu, S., Doiron, K., Rioux, L.-E., & Turgeon, S. L. (2015). Characterization of antibacterial activity from protein hydrolysates of the macroalga *Saccharina longicruris* and identification of peptides implied in bioactivity. *Journal of Functional Foods*, 17, 685-697. doi: 10.1016/j.jff.2015.06.026
- Beaulieu, L., Thibodeau, J., Bonnet, C., Bryl, P., & Carbonneau, M.-É. (2013). Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of Atlantic rock crab (*Cancer irroratus*) by-products. *PharmaNutrition*, 1(4), 149-157. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phanu.2013.05.004>
- Benhabiles, M. S., Abdi, N., Drouiche, N., Lounici, H., Pauss, A., Goosen, M. F. A., & Mameri, N. (2012). Fish protein hydrolysate production from sardine solid waste by crude pepsin enzymatic hydrolysis in a bioreactor coupled to an ultrafiltration unit. *Materials Science and Engineering: C*, 32(4), 922-928. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.02.013>
- Bermejo-Poza, R., De la Fuente, J., Pérez, C., González de Chavarri, E., Diaz, M. T., Torrent, F., & Villarroel, M. (2017). Determination of optimal degree days of fasting before slaughter in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 473, 272-277. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.036>

- Bessalle, R., Kapitkovsky, A., Gorea, A., Shalit, I., & Fridkin, M. (1990). All-D-magainin: chirality, antimicrobial activity and proteolytic resistance. *FEBS Letters*, 274(1), 151-155. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81351-N](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(90)81351-N)
- Bessin, Y., Saint, N., Marri, L., Marchini, D., & Molle, G. (2004). Antibacterial activity and pore-forming properties of ceratotoxins: a mechanism of action based on the barrel stave model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1667(2), 148-156. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.09.011>
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., & Lalitha, R. G. (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*, 99(2), 335-343. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.015>
- Borawska, J., Darewicz, M., Vegarud, G. E., & Minkiewicz, P. (2016). Antioxidant properties of carp (*Cyprinus carpio* L.) protein ex vivo and in vitro hydrolysates. *Food Chemistry*, 194, 770-779. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.075>
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*, 118(3), 559-565. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.021>
- Cai, Z., Li, W., Mai, K., Xu, W., Zhang, Y., & Ai, Q. (2015). Effects of dietary size-fractionated fish hydrolysates on growth, activities of digestive enzymes and aminotransferases and expression of some protein metabolism related genes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) larvae. *Aquaculture*, 440, 40-47. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.026>
- Carpenter, H. M., Fredrickson, L. S., Williams, D. E., Buhler, D. R., & Curtis, L. R. (1990). The effect of thermal acclimation on the activity of arylhydrocarbon hydroxylase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 97(1), 127-132. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413\(90\)90182-9](http://dx.doi.org/10.1016/0742-8413(90)90182-9)
- Cauca, U. d. (2015). Alternativas para el aprovechamiento de subproductos piscícolas: Univesridad del Cauca.
- Chalamaiah, M., Dinesh kumar, B., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, 135(4), 3020-3038. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100>
- Chang, C., Li, X., Li, J., Niu, F., Zhang, M., Zhou, B., . . . Yang, Y. (2017). Effect of enzymatic hydrolysis on characteristics and synergistic efficiency of pectin on emulsifying properties of egg white protein. *Food Hydrocolloids*, 65, 87-95. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.004>
- Chen, N., Yang, H., Sun, Y., Niu, J., & Liu, S. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. *Peptides*, 38(2), 344-349. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.09.017>
- Chi, C.-F., Wang, B., Hu, F.-Y., Wang, Y.-M., Zhang, B., Deng, S.-G., & Wu, C.-W. (2015). Purification and identification of three novel antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) skin. *Food Research International*, 73, 124-129. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.038>
- Chi, C.-F., Wang, B., Wang, Y.-M., Zhang, B., & Deng, S.-G. (2015). Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads. *Journal of Functional Foods*, 12, 1-10. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.027>

- Chia, T.-J., Wu, Y.-C., Chen, J.-Y., & Chi, S.-C. (2010). Antimicrobial peptides (AMP) with antiviral activity against fish nodavirus. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(3), 434-439. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.020>
- Delaney, B., Astwood, J. D., Cunny, H., Conn, R. E., Herouet-Guicheney, C., MacIntosh, S., . . . Levine, M. (2008). Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. *Food and Chemical Toxicology*, 46, Supplement 2, S71-S97. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.045>
- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., & Hayes, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4), 1296-1307. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.004>
- Dolashka, P., Moshtanska, V., Borisova, V., Dolashki, A., Stevanovic, S., Dimanov, T., & Voelter, W. (2011). Antimicrobial proline-rich peptides from the hemolymph of marine snail *Rapana venosa*. *Peptides*, 32(7), 1477-1483. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2011.05.001>
- Dumas, A., de Lange, C. F. M., France, J., & Bureau, D. P. (2007). Quantitative description of body composition and rates of nutrient deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 273(1), 165-181. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.026>
- Eklund, A. (1976). On the determination of available lysine in casein and rapeseed protein concentrates using 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) as a reagent for free epsilon amino group of lysine. *Analytical Biochemistry*, 70(2), 434-439. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90467-X](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90467-X)
- Ennaas, N., Hammami, R., Beaulieu, L., & Fliss, I. (2015a). Production of antibacterial fraction from Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) and its processing by-products using commercial enzymes. *Food and Bioprocess Processing*, 96, 145-153. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2015.07.014>
- Ennaas, N., Hammami, R., Beaulieu, L., & Fliss, I. (2015b). Purification and characterization of four antibacterial peptides from protamex hydrolysate of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) by-products. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 462(3), 195-200. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.091>
- Ferraro, V., Carvalho, A. P., Piccirillo, C., Santos, M. M., L. Castro, P. M., & E. Pintado, M. (2013). Extraction of high added value biological compounds from sardine, sardine-type fish and mackerel canning residues — A review. *Materials Science and Engineering: C*, 33(6), 3111-3120. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.04.003>
- Galla, N. R., Pamidighantam, P. R., Akula, S., & Karakala, B. (2012). Functional properties and in vitro antioxidant activity of roe protein hydrolysates of *Channa striatus* and *Labeo rohita*. *Food Chemistry*, 135(3), 1479-1484. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.098>
- García-Mora, P., Martín-Martínez, M., Angeles Bonache, M., González-Múniz, R., Peñas, E., Frias, J., & Martínez-Villaluenga, C. (2017). Identification, functional gastrointestinal stability and molecular docking studies of lentil peptides with dual antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities. *Food Chemistry*, 221, 464-472. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.087>
- Goddard, J. S., & Perret, J. S. M. (2005). Co-drying fish silage for use in aquafeeds. *Animal Feed Science and Technology*, 118(3-4), 337-342. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeeds.2004.11.004>

- Goosen, N. J., de Wet, L. F., & Görgens, J. F. (2014). The effects of protein hydrolysates on the immunity and growth of the abalone *Haliotis midae*. *Aquaculture*, 428–429, 243–248. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.018>
- Goosen, N. J., de Wet, L. F., Görgens, J. F., Jacobs, K., & de Bruyn, A. (2014). Fish silage oil from rainbow trout processing waste as alternative to conventional fish oil in formulated diets for Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Animal Feed Science and Technology*, 188, 74–84. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.10.019>
- Guzman, F., Marshall, S., Cardenas, C., Arenas, G., Mercado, L., & Albericio, F. (2010). Antibacterial activity of short cationic model peptides. *Journal of Biotechnology*, 150, Supplement, 204. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.09.010>
- Halim, N. R. A., Yusof, H. M., & Sarbon, N. M. (2016). Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 24–33. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.02.007>
- Halldorsdottir, S. M., Sveinsdottir, H., Gudmundsdottir, A., Thorkelsson, G., & Kristinsson, H. G. (2014). High quality fish protein hydrolysates prepared from by-product material with *Fucus vesiculosus* extract. *Journal of Functional Foods*, 9, 10–17. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.009>
- Harnedy, P. A., & FitzGerald, R. J. (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 6–24. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2011.09.001>
- Je, J.-Y., Park, P.-J., & Kim, S.-K. (2005). Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Research International*, 38(1), 45–50. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2004.07.005>
- Je, J.-Y., Park, S. Y., Hwang, J.-Y., & Ahn, C.-B. (2015). Amino acid composition and in vitro antioxidant and cytoprotective activity of abalone viscera hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 16, 94–103. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.023>
- Jiang, H., Tong, T., Sun, J., Xu, Y., Zhao, Z., & Liao, D. (2014). Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 154, 158–163. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.074>
- Kechaou, E. S., Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Jaouen, P., Gouygou, J.-P., Bergé, J.-P., & Amar, R. B. (2009). Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(2), 158–164. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2008.10.018>
- Ketnawa, S., Benjakul, S., Martínez-Alvarez, O., & Rawdkuen, S. (2014). Three-phase partitioning and proteins hydrolysis patterns of alkaline proteases derived from fish viscera. *Separation and Purification Technology*, 132, 174–181. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2014.05.006>
- Ketnawa, S., Martínez-Alvarez, O., Benjakul, S., & Rawdkuen, S. (2016). Gelatin hydrolysates from farmed Giant catfish skin using alkaline proteases and its antioxidative function of simulated gastro-intestinal digestion. *Food Chemistry*, 192, 34–42. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.087>
- Khosravi, S., Rahimnejad, S., Herault, M., Fournier, V., Lee, C.-R., Dio Bui, H. T., . . . Lee, K.-J. (2015). Effects of protein hydrolysates supplementation in low fish meal diets on growth performance, innate immunity and disease resistance of red sea bream *Pagrus major*. *Fish & Shellfish Immunology*, 45(2), 858–868. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.039>



- Kim, S.-K., & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 1-9. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2010.01.003>
- Kim, S.-R., & Byun, H.-G. (2012). The novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from rainbow trout muscle hydrolysate. *Fisheries and aquatic sciences*, 15(3), 183-190.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 89(3), 363-372. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.042>
- Klomklao, S., Kishimura, H., & Benjakul, S. (2013). Use of viscera extract from hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*) for the production of protein hydrolysate from toothed ponyfish (*Gazza minuta*) muscle. *Food Chemistry*, 136(2), 1006-1012. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.037>
- Ko, J.-Y., Lee, J.-H., Samarakoon, K., Kim, J.-S., & Jeon, Y.-J. (2013). Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 113-120. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.058>
- Kotzamanis, Y. P., Gisbert, E., Gatesoupe, F. J., Zambonino Infante, J., & Cahu, C. (2007). Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147(1), 205-214. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.12.037>
- Ktari, N., Fakhfakh, N., Balti, R., Ben Khaled, H., Nasri, M., & Bougatef, A. (2013). Effect of Degree of Hydrolysis and Protease Type on the Antioxidant Activity of Protein Hydrolysates From Cuttlefish (*Sepia officinalis*) By-Products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 22(5), 436-448. doi: 10.1080/10498850.2012.658961
- Lassoued, I., Mora, L., Barkia, A., Aristoy, M. C., Nasri, M., & Toldrá, F. (2015). Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Proteomics*, 128, 8-17. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.06.016>
- Lee, M. H. (1995). Official methods of analysis of AOAC International (16th edn). *Trends in Food Science & Technology*, 6(11), 382. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0924-2244\(95\)90022-5](http://dx.doi.org/10.1016/0924-2244(95)90022-5)
- Lehninger, A., Nelson, D., & Cox, M. (2008). *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman.
- Li, Y.-W., & Li, B. (2013). Characterization of structure–antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using QSAR models: Key sequence positions and their amino acid properties. *Journal of Theoretical Biology*, 318, 29-43. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.10.029>
- Liu, S., & Liu, Z. (2014). A new method to measure small peptides amended in seawater using high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Marine Chemistry*, 164, 16-24. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marchem.2014.05.006>
- Liu, Y., Li, X., Chen, Z., Yu, J., Wang, F., & Wang, J. (2014). Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. *Food Chemistry*, 151, 459-465. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.089>



- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Brock, T. D. (2006). *Brock biology of microorganisms*. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.
- Malanovic, N., & Lohner, K. (2016). Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(5), 936-946. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.004>
- Martínez-Alvarez, O., Chamorro, S., & Brenes, A. (2015). Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food Research International*, 73, 204-212. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.005>
- Meikle, T. G., Zabara, A., Waddington, L. J., Separovic, F., Drummond, C. J., & Conn, C. E. (2017). Incorporation of antimicrobial peptides in nanostructured lipid membrane mimetic bilayer cubosomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 152, 143-151. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.004>
- Merino, M. C., Bonilla, S. P., & Bages, F. (2013). *Diagnóstico del estado de la Acuicultura en Colombia*.
- 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. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.122>
- Mulero Cánovas, J., Zafrilla Rentero, P., Martínez-Cachá Martínez, A., Leal Hernández, M., & Abellán Alemán, J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 23(5), 219-227. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arteri.2011.04.004>
- Nalinanon, S., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2010). Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chemistry*, 121(1), 49-55. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.089>
- Nazeer, R. A., Sampath Kumar, N. S., & Jai Ganesh, R. (2012). In vitro and in vivo studies on the antioxidant activity of fish peptide isolated from the croaker (*Otolithes ruber*) muscle protein hydrolysate. *Peptides*, 35(2), 261-268. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.03.028>
- Nguyen, H. T. M., Pérez-Gálvez, R., & Bergé, J. P. (2012). Effect of diets containing tuna head hydrolysates on the survival and growth of shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 324-325, 127-134. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.11.014>
- Nikoo, M., Benjakul, S., & Xu, X. (2015). Antioxidant and cryoprotective effects of Amur sturgeon skin gelatin hydrolysate in unwashed fish mince. *Food Chemistry*, 181, 295-303. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.095>
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., & Assavanig, A. (2005). Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering*, 70(4), 571-578. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.10.011>
- Olkowicz, M., Radulska, A., Suraj, J., Kij, A., Walczak, M., Chlopicki, S., & Smolenski, R. T. (2015). Development of a sensitive, accurate and robust liquid chromatography/mass spectrometric method for profiling of angiotensin peptides in plasma and its application for atherosclerotic mice. *Journal of Chromatography A*, 1393, 37-46. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.012>

- Olsen, R. L., Toppe, J., & Karunasagar, I. (2014). Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. *Trends in Food Science & Technology*, 36(2), 144-151. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.007>
- . Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2015a), 2015
- . Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2015b).
- Pane, K., Durante, L., Crescenzi, O., Cafaro, V., Pizzo, E., Varcamonti, M., . . . Notomista, E. (2017). Antimicrobial potency of cationic antimicrobial peptides can be predicted from their amino acid composition: Application to the detection of “cryptic” antimicrobial peptides. *Journal of Theoretical Biology*, 419, 254-265. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.02.012>
- Peinado, I., Koutsidis, G., & Ames, J. (2016). Production of seafood flavour formulations from enzymatic hydrolysates of fish by-products. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 444-452. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.025>
- Rajanbabu, V., & Chen, J.-Y. (2011). Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides*, 32(2), 415-420. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2010.11.005>
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24(6), 536-547. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.005>
- Robert, M., Zatylny-Gaudin, C., Fournier, V., Corre, E., Le Corguillé, G., Bernay, B., & 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. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.022>
- Roslan, J., Yunos, K. F. M., Abdullah, N., & Kamal, S. M. M. (2014). Characterization of Fish Protein Hydrolysate from Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) by-Product. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 312-319. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.044>
- Sabeena Farvin, K. H., Andersen, L. L., Nielsen, H. H., Jacobsen, C., Jakobsen, G., Johansson, I., & Jessen, F. (2014). Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. *Food Chemistry*, 149, 326-334. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.075>
- Samaranayaka, A. G. P., & Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 229-254. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2011.05.006>
- Sanz, A., García Gallego, M., & De la Higuera, M. (2000). Protein nutrition in fish: protein/energy ratio and alternative protein sources to fish meal. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 56(3), 275-282. doi: 10.1007/bf03179795
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>
- Schlueter, N., de Sterke, A., Willmes, D. M., Spranger, J., Jordan, J., & Birkenfeld, A. L. (2014). Metabolic actions of natriuretic peptides and therapeutic potential in the metabolic syndrome. *Pharmacology & Therapeutics*, 144(1), 12-27. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.04.007>
- Shao, C., Zhang, Y., & Sun, W. (2014). Statistical characterization of HCD fragmentation patterns of tryptic peptides on an LTQ Orbitrap Velos mass spectrometer. *Journal of Proteomics*, 109, 26-37. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.06.012>

- Shirahigue, L. D., Silva, M. O., Camargo, A. C., Sucasas, L. F. d. A., Borghesi, R., Cabral, I. S. R., . . . Oetterer, M. (2016). The Feasibility of Increasing Lipid Extraction in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Waste by Proteolysis. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(2), 265-271. doi: 10.1080/10498850.2013.845276
- Sila, A., & Bougatef, A. (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods*, 21, 10-26. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.007>
- Šližytė, R., Mozuraitytė, R., Martínez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M., & Rustad, T. (2009). Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. *Process Biochemistry*, 44(6), 668-677. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2009.02.010>
- Song, R., Wei, R.-b., Ruan, G.-q., & Luo, H.-y. (2015). Isolation and identification of antioxidative peptides from peptic hydrolysates of half-fin anchovy (*Setipinna taty*). *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 221-229. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.043>
- Su, Y., Feng, J., Liu, C., Li, W., Xie, Y., & Li, A. (2017). Dynamic bacterial colonization and microscopic lesions in multiple organs of tilapia infected with low and high pathogenic *Streptococcus agalactiae* strains. *Aquaculture*, 471, 190-203. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.01.013>
- Suárez, M. D., García-Gallego, M., Trenzado, C. E., Guil-Guerrero, J. L., Furné, M., Domezain, A., . . . Sanz, A. (2014). Influence of dietary lipids and culture density on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) flesh composition and quality parameter. *Aquacultural Engineering*, 63, 16-24. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.09.001>
- Szabo, Z., & Janaky, T. (2015). Challenges and developments in protein identification using mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 69, 76-87. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.03.007>
- Tahergorabi, R., Beamer, S. K., Matak, K. E., & Jaczynski, J. (2012). Functional food products made from fish protein isolate recovered with isoelectric solubilization/precipitation. *LWT - Food Science and Technology*, 48(1), 89-95. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.02.018>
- Taheri, A., Anvar, S. A. A., Ahari, H., & Fogliano, V. (2013). Comparison the functional properties of protein Hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(1), 154-169.
- Teixeira, V., Feio, M. J., & Bastos, M. (2012). Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research*, 51(2), 149-177. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.005>
- Toopcham, T., Mes, J. J., Wichers, H. J., & Yongsawatdigul, J. (2017). Immunomodulatory activity of protein hydrolysates derived from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 proteinase. *Food Chemistry*, 224, 320-328. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.041>
- Toopcham, T., Roytrakul, S., & Yongsawatdigul, J. (2015). Characterization and identification of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from tilapia using *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 proteinases. *Journal of Functional Foods*, 14, 435-444. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.050>
- Udenigwe, C. C. (2014). Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends in Food Science & Technology*, 36(2), 137-143. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.004>

- Valenzuela B, A., Sanhueza C, J., & de la Barra D, F. (2012). EL ACEITE DE PESCADO: AYER UN DESECHO INDUSTRIAL, HOY UN PRODUCTO DE ALTO VALOR NUTRICIONAL. *Revista chilena de nutrición*, 39, 201-209.
- Vannabun, A., Ketnawa, S., Phongthai, S., Benjakul, S., & Rawdkuen, S. (2014). Characterization of acid and alkaline proteases from viscera of farmed giant catfish. *Food Bioscience*, 6, 9-16. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2014.01.001>
- Vidotti, R. M., Viegas, E. M. M., & Carneiro, D. J. (2003). Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology*, 105(1-4), 199-204. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00056-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00056-7)
- Villalba-Villalba, A. G., Ramírez-Suárez, J. C., Valenzuela-Soto, E. M., Sánchez, G. G., Ruiz, G. C., & Pacheco-Aguilar, R. (2013). Trypsin from viscera of vermiculated sailfin catfish, *Pterygoplichthys disjunctivus*, Weber, 1991: Its purification and characterization. *Food Chemistry*, 141(2), 940-945. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.078>
- Voet, D. *Biochemistry, 2nd Second Edition*: Wiley.
- Volkoff, H. (2014). In vitro assessment of interactions between appetite-regulating peptides in brain of goldfish (*Carassius auratus*). *Peptides*, 61, 61-68. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.002>
- Wald, M., Rehbein, H., Beermann, C., Bußmann, B., & Schwarz, K. (2016). Purification and characterization of pepsinogen and pepsin from the stomach of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal Eur Food Res Technol*, 242, 1925–1935. doi: 10.1007/s00217-016-2692-2
- Wald, M., Schwarz, K., Rehbein, H., Bußmann, B., & Beermann, C. (2016). Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. *Food Chemistry*, 205, 221-228. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.002>
- Wang, T.-Y., Hsieh, C.-H., Hung, C.-C., Jao, C.-L., Chen, M.-C., & Hsu, K.-C. (2015). Fish skin gelatin hydrolysates as dipeptidyl peptidase IV inhibitors and glucagon-like peptide-1 stimulators improve glycaemic control in diabetic rats: A comparison between warm- and cold-water fish. *Journal of Functional Foods*, 19, Part A, 330-340. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.037>
- Wieprecht, T., Apostolov, O., & Seelig, J. (2000). Binding of the antibacterial peptide magainin 2 amide to small and large unilamellar vesicles. *Biophysical Chemistry*, 85(2-3), 187-198. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-4622\(00\)00120-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-4622(00)00120-4)
- Wieprecht, T., Dathe, M., Krause, E., Beyermann, M., Maloy, W. L., MacDonald, D. L., & Bienert, M. (1997). Modulation of membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides by slight modifications of the hydrophobic moment. *FEBS Letters*, 417(1), 135-140. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01266-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01266-0)
- Xu, Y., Bao, T., Han, W., Chen, W., Zheng, X., & Wang, J. (2016). Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from cauliflower by-products protein hydrolysate. *Process Biochemistry*, 51(9), 1299-1305. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.05.023>
- Yeaman, M. R., Yount, N. Y., Waring, A. J., Gank, K. D., Kupferwasser, D., Wiese, R., . . . Welch, W. H. (2007). Modular determinants of antimicrobial activity in platelet factor-4 family kinocidins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(3), 609-619. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.11.010>
- Zhang, Y., Duan, X., & Zhuang, Y. (2012). Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*)

skin gelatin. *Peptides*, 38(1), 13-21. doi:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.014>

Zhou, D.-Y., Zhu, B.-W., Qiao, L., Wu, H.-T., Li, D.-M., Yang, J.-F., & Murata, Y. (2012). In vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) viscera. *Food and Bioprocess Processing*, 90(2), 148-154. doi:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2011.02.002>