

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**



**“ESTUDIO DE LA HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS EN
ANCHOVETA ENTERA (*Engraulis ringens*) POR ACCIÓN
ENZIMÁTICA”.**

PRESENTADO POR:

Bach. LEÓN VÁSQUEZ SUSAN CAROLINA

Bach. SIFUENTES PENAGOS GABRIEL OMAR

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

CHIMBOTE – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



HOJA DEL AVAL DEL JURADO EVALUADOR

El presente trabajo de tesis titulado “ESTUDIO DE LA HIDROLISIS DE PROTEINAS DE ANCHOVETA ENTERA (*Engraulis ringens*) POR ACCIÓN ENZIMÁTICA” para obtener el título profesional de Ingeniero Agroindustrial, presentado por Bach. SUSAN CAROLINA LEÓN VÁSQUEZ Y Bach. GABRIEL OMAR SIFUENTES PENAGOS, que tienen como Asesor al docente Dr. Augusto Castillo Calderón designado por resolución N° 229–2016–UNS-FI. Ha sido revisado y aprobado el día 03 de Noviembre del 2017 por el siguiente jurado evaluador, designado mediante resolución N°163-2017-UNS-FI.

Dra. Elza Aguirre Vargas
Presidente

Dr. Augusto Castillo Calderón
Secretario (Asesor)

Ing. Rogger Romero Usquiano
Integrante



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA



FACULTAD DE INGENIERÍA

E.A.P. DE INGENIERÍA DE AGROINDUSTRIAL

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 10 a.m. del 03 de Noviembre del dos mil diecisiete se instaló en el Auditorio de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial, el Jurado Evaluador, designado mediante resolución N° 163-2017-UNS-CFI integrado por los docentes:

- **Dra. Elza Aguirre Vargas** (Presidente)
- **Dr. Augusto Castillo Calderón** (Secretario)
- **Ing. Rogger Romero Usquiano** (Integrante); para inicio a la Sustentación y Evaluación de Tesis, titulada:

“Estudio de la hidrolisis de proteínas en anchoveta entera (*Engraulis ringens*) por acción enzimática”, elaborada por los bachilleres en Ingeniería Agroindustrial.

- **Bach. Susan Carolina León Vásquez**
- **Bach. Gabriel Omar Sifuentes Penagos**

Asimismo, tienen como Asesor al docente: **Dr. Augusto Castillo Calderón**

Finalizada la sustentación, los Tesistas respondieron las preguntas formuladas por los miembros del Jurado y el Público presente.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo, y con las sugerencias pertinentes y en concordancia con el Artículo 39° y 40° del Reglamento de Grados y títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:

BACHILLER	PROMEDIO VIGESIMAL	PONDERACIÓN
Susan Carolina León Vásquez		

Siendo las 11:15 am del mismo día, se dio por terminada dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el presente jurado.

Nuevo Chimbote, 03 de Noviembre del 2017

Dra. Elza Aguirre Vargas
Presidente

Dr. Augusto Castillo Calderón
Secretario

Ing. Rogger Romero Usquiano
Integrante



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA



FACULTAD DE INGENIERÍA

E.A.P. DE INGENIERÍA DE AGROINDUSTRIAL

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 10 a.m. del 03 de Noviembre del dos mil diecisiete se instaló en el Auditorio de la Escuela Académica Profesional de Ingeniería Agroindustrial, el Jurado Evaluador, designado mediante resolución N° 163-2017-UNS-CFI integrado por los docentes:

- **Dra. Elza Aguirre Vargas** (Presidente)
- **Dr. Augusto Castillo Calderón** (Secretario)
- **Ing. Rogger Romero Usquiano** (Integrante); para inicio a la Sustentación y Evaluación de Tesis, titulada:

“Estudio de la hidrolisis de proteínas en anchoveta entera (*Engraulis ringens*) por acción enzimática”, elaborada por los bachilleres en Ingeniería Agroindustrial.

- **Bach. Susan Carolina León Vásquez**
- **Bach. Gabriel Omar Sifuentes Penagos**

Asimismo, tienen como Asesor al docente: **Dr. Augusto Castillo Calderón**

Finalizada la sustentación, los Tesistas respondieron las preguntas formuladas por los miembros del Jurado y el Público presente.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo, y con las sugerencias pertinentes y en concordancia con el Artículo 39° y 40° del Reglamento de Grados y títulos de la Universidad Nacional del Santa, declaran:

BACHILLER	PROMEDIO VIGESIMAL	PONDERACIÓN
Gabriel Omar Sifuentes Penagos		

Siendo las 11:15 am del mismo día, se dio por terminada dicha sustentación, firmando en señal de conformidad el presente jurado.

Nuevo Chimbote, 03 de Noviembre del 2017

Dra. Elza Aguirre Vargas
Presidente

Dr. Augusto Castillo Calderón
Secretario

Ing. Rogger Romero Usquiano
Integrante

DEDICATORIA

A mis padres Martin y Karina, mi hermanita Fátima y mi mamita Violeta por todo su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles, y brindarme los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia y mi coraje para conseguir mis objetivos.

Gabriel

A mis padres Luis y Carolina por el apoyo en todos estos años, a mi hermano Anthony por su cariño y comprensión y especialmente a mi hermano Alexander quien me impulsó a lograr todas mis metas. Gracias infinitas para ustedes por formarme como un ser humano capaz de lograr lo que se propone y heredarme los valores y principios que son necesarios para ser una buena persona.

Susan

AGRADECIMIENTO

A Dios quien supo guiarnos por el buen camino, darnos fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándonos a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mis profesores de la E.A.P. de Ingeniería Agroindustrial, por ser parte de mi formación profesional. En Especial al Dr. Augusto Castillo Calderón por su asesoría y dedicación, sus conocimientos, orientaciones, manera de trabajar, y su motivación han sido fundamentales para la culminación de este trabajo.

A la Blgo-Mblgo. Ruth Guimaray, por su orientación y apoyo desinteresado al abrirnos las puertas de su laboratorio de análisis físico-químicos ABBSER S.R.L., las cuales han permitido finalizar esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	xv
ABSTRACT.....	xvi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. MATERIA PRIMA.....	5
2.1.1. Características de la especie	5
2.1.2. Posición y distribución geográfica.....	6
2.1.3. Composición química	6
2.2. HIDRÓLISIS PROTEICA	7
2.2.1. Métodos químicos en la hidrólisis de proteínas.....	7
2.2.2. Métodos biológicos en la hidrólisis de proteínas.....	8
2.3. HIDRÓLISIS PROTEICA POR ACCIÓN ENZIMÁTICA	9
2.3.1. Sustrato	9
2.3.1.1. Hidrolizados proteicos a partir de piel de pescados	10
2.3.1.2. Hidrolizados proteicos a partir de cabezas de pescados.....	11
2.3.1.3. Hidrolizados proteicos a partir de músculo de pescados.....	13
2.3.1.4. Hidrolizados proteicos a partir de vísceras de pescados	14
2.3.1.5. Hidrolizados proteicos a partir de hígado de pescados	15
2.3.1.6. Hidrolizados proteicos a partir de espinas de pescados.....	15
2.3.1.7. Hidrolizados proteicos a partir de gónadas de pescados	16
2.3.2. Enzimas proteolíticas	17
2.3.3. Reacción de la hidrólisis enzimática.....	20
2.3.4. Control de la reacción de hidrólisis enzimática	21
2.3.4.1. Determinación del grado de hidrólisis.....	23
2.3.4.2. Distribución aparente del peso molecular	25
2.3.5. Etapas de la hidrólisis enzimática.....	27

III.	MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN	30
3.2.	MATERIALES	30
3.2.1.	Materia prima.....	30
3.2.2.	Enzima	31
3.3.	MÉTODOS	33
3.3.1.	Determinación de la actividad proteolítica	33
3.3.2.	Determinación de los parámetros cinéticos	37
3.3.3.	Composición química proximal de la anchoveta entera	39
3.3.4.	Hidrólisis enzimática	39
3.3.4.1.	Determinación del grado de hidrólisis.....	43
3.3.4.2.	Recuperación de proteína	43
3.3.4.3.	Distribución aparente del peso molecular	44
3.3.5.	Mecanismo de reacción	45
3.3.5.1.	Efecto del agotamiento de sustrato en la velocidad inicial.....	46
3.3.5.2.	Efecto de los productos en la velocidad inicial	47
3.3.5.3.	Efecto de la inactivación térmica de la enzima	48
3.3.5.4.	Determinación de la velocidad inicial de hidrólisis	49
3.3.5.5.	Cálculo de los parámetros cinéticos	50
3.3.5.6.	Simulación de las curvas de hidrólisis.....	52
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
4.1.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	54
4.2.	DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS.....	55
4.3.	COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL DE LA ANCHOVETA ENTERA	56
4.4.	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	57

4.5. EVALUACIÓN DEL GRADO DE HIDROLISIS, RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS Y DISTRIBUCIÓN APARENTE DEL PESO MOLECULAR DE LOS PÉPTIDOS OBTENIDOS	62
4.5.1. Grado de hidrolisis	64
4.5.1.1. Efecto de la relación enzima sustrato	71
4.5.1.2. Efecto del factor de dilución.....	72
4.5.1.3. Efecto del tiempo de reacción	72
4.5.2. Recuperación de proteína.....	73
4.5.2.1. Efecto de la relación enzima sustrato	80
4.5.2.2. Efecto del factor de dilución.....	81
4.5.2.3. Efecto del tiempo de reacción	82
4.5.3. Distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos	84
4.5.3.1. Efecto de la relacion enzima sustrato	93
4.5.3.2. Efecto del factor de dilución.....	93
4.5.3.3. Efecto del tiempo de reacción	94
4.6. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	94
4.7. IDENTIFICACIÓN DEL MECANISMO DE REACCIÓN.....	97
4.7.1. Hipótesis 1: agotamiento de los enlaces peptídicos.....	98
4.7.2. Hipótesis 2: inhibición por producto	101
4.7.3. Hipótesis 3: inactivación térmica de la enzima	105
V. CONCLUSIONES	111
VI. RECOMENDACIONES.....	112
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES	113
VIII. ANEXOS	128

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Composición proximal de pescado anchoveta, fresco crudo	6
Cuadro 2: Proteasas para la producción de hidrolizados de proteínas alimentarias	19
Cuadro 3: Métodos para la medición del grado de hidrólisis	22
Cuadro 4: Preparación de las concentraciones de caseína para la determinación de los parámetros cinéticos ' K_m ' y ' $V_{máx}$ '	38
Cuadro 5: Ensayos del diseño experimental, variando la relación enzima sustrato (E/S), el factor de dilución (D) y el tiempo de reacción (t).....	42
Cuadro 6: Modelos de rendimiento para un reactor enzimático de tanque agitado por lotes para reacciones de un solo sustrato	53
Cuadro 7: Composición por 100 g de anchoveta entera	56
Cuadro 8: Resultados experimentales del grado de hidrólisis y de la recuperación de proteína en los 15 ensayos del diseño experimental	63
Cuadro 9: Efecto estimado, error estándar, coeficiente t y significancia estadística para cada factor en el modelo codificado para la respuesta grado de hidrólisis	64
Cuadro 10: Análisis de varianza del modelo ajustado para la respuesta grado de hidrólisis.....	65
Cuadro 11: Efecto estimado, error estándar, coeficiente t y significancia estadística para cada factor en el modelo codificado para la respuesta recuperación de proteínas.....	74
Cuadro 12: Análisis de varianza del modelo ajustado para la respuesta recuperación de proteína	75
Cuadro 13: Efecto estimado, error estándar, coeficiente t y significancia estadística para cada factor en el modelo codificado para la respuesta distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos	85
Cuadro 14: Análisis de varianza del modelo ajustado para la respuesta distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos	86
Cuadro 15: Constantes cinéticas para la hidrólisis de proteínas de anchoveta entera por acción enzima comercial Protamex™ a 55 °C para la curva de la figura 24.....	100
Cuadro 16: Pendientes e intercepciones de las gráficas de Lineweaver-Burk de la figura 26	102
Cuadro 17: Constantes cinéticas obtenidas a partir de las ecuaciones 12 y 13	103
Cuadro 18: Constantes cinéticas de primer orden para la inactivación térmica de la enzima Protamex™ en condiciones reactivas y no reactivas	108

Cuadro 19: Valores de Absorbancia a 660 nm para dilución de tirosina	128
Cuadro 20: Concentraciones de tirosina a través del tiempo a diferentes diluciones enzimáticas.....	129
Cuadro 21: Determinación de la actividad enzimática para dilución	129
Cuadro 22: Determinación de la velocidad inicial de reacción para el sustrato caseína	130
Cuadro 23: Inversa del sustrato vs. Inversa de la velocidad inicial	130
Cuadro 24: Cantidad de pescado, agua y enzima para cada ensayo de la metodología experimental.....	131
Cuadro 25: Grado de hidrólisis en las experiencias del mecanismo de reacción - hipótesis 1	132
Cuadro 26: Grado de hidrólisis en las experiencias del mecanismo de reacción - hipótesis 2	133
Cuadro 27: Grado de hidrólisis en las experiencias del mecanismo de reacción - hipótesis 3	134
Cuadro 28: Grado de conversión a diferentes S_i/K utilizando el modelo de inhibición por sustrato.....	135
Cuadro 29: Grado de conversión utilizando el modelo de inhibición por producto.....	136
Cuadro 30: Grado de conversión utilizando el modelo de inactivación térmica	137

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la reacción catalizada por la proteasa (pH ~ 6).....	20
Figura 2: Mecanismo catalítico de una proteasa. Fuente: (Adler-Nissen, 1993).....	27
Figura 3: Teoría de Linderstrom-Lang. Fuente: (Whitaker, 1994).....	28
Figura 4: Almacenamiento temporal de la anchoveta entera.....	31
Figura 5: Envase de la proteasa de Bacillus sp. “Protamex”.....	32
Figura 6: Disminución gradual de la concentración de tirosina por acción de la enzima Protamex.....	34
Figura 7: Montaje experimental para la hidrólisis enzimática de proteínas en anchoveta entera, biorreactor 2L.....	41
Figura 8: Corrida electroforética de los hidrolizados de anchoveta.	44
Figura 9: Calentamiento de las muestras a 65°C durante 20 minutos.	45
Figura 10: Formación de tirosina en función del tiempo a diferentes diluciones enzimáticas.....	54
Figura 11: Representación de Lineweaver y Burk para la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima Protamex™.....	56
Figura 12: A la izquierda, mezcla inicial de pescado con agua, a la derecha el hidrolizado proteico.	58
Figura 13: Cinética de hidrólisis enzimática en anchoveta entera a 60 minutos de reacción.....	59
Figura 14: Cinética de hidrólisis enzimática en anchoveta entera a 120 minutos de reacción.....	59
Figura 15: Cinética de hidrólisis enzimática en anchoveta entera 180 minutos de reacción.....	60
Figura 16: Cinética de hidrólisis enzimática en anchoveta entera puntos centrales.	60
Figura 17: Superficies de respuesta graficadas a partir del modelo de grado de hidrólisis.	68
Figura 18: Superficies de respuesta graficadas a partir del modelo de recuperación de proteínas.....	77
Figura 19: Formación de emulsión en el transcurso de la hidrólisis.	84
Figura 20: Superficies de respuesta graficadas a partir del modelo de distribución del peso molecular.....	88

Figura 21: Perfil electroforético SDS-PAGE, gel al 15% para las primeras 8 experiencias.	90
Figura 22: Perfil electroforético SDS-PAGE, gel al 15% para las últimas 7 experiencias.	91
Figura 23: Perfil del valor de deseabilidad para maximizar el valor del grado de hidrólisis y la recuperación de proteína.	96
Figura 24: Velocidad inicial de hidrólisis de proteínas de anchoveta entera por acción de la enzima comercial Protamex™ frente a la concentración de enlaces peptídicos. Puntos provienen de datos experimentales y la línea continua proviene a la regresión no lineal.....	99
Figura 25: Simulaciones del grado de conversión (X) frente al tiempo adimensional para la hidrólisis de la proteína de anchoveta entera por acción de la enzima Protamex™ para diferentes relaciones S_0 / K_m iniciales utilizando el modelo desarrollado a partir de la ecuación 8, junto con los datos experimentales.	101
Figura 26: Pendientes de Lineweaver-Burk.....	102
Figura 27: Simulaciones del grado de conversión (X) frente al tiempo adimensional (líneas) para la hidrólisis de proteína de anchoveta entera por la enzima Protamex™ basada en el modelo cinético (KM) en la ecuación 8 y considerando la inhibición del producto (PI) junto con los datos experimentales.....	105
Figura 28: Inactivación termina de la enzima comercial Protamex™ a una temperatura de 55 °C en condiciones reactivas y no reactivas con diferentes concentraciones de sustratos y producto hidrolizado.	107
Figura 29: Simulaciones del grado de conversión (X) frente al tiempo adimensional (líneas) para la hidrólisis de proteína de anchoveta entera por la enzima Protamex™ basada en el modelo cinético (KM) en la ecuación 8 y considerando la inhibición por inactivación térmica de la enzima (KM + PI + EI).....	109
Figura 30: Curva de calibrado para tirosina.....	128
Figura 31: Representación gráfica de Lineweaver-Burk para caseína y Protamex	130

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Determinación de la curva de calibrado para L-tirosina.....	128
ANEXO 2: Determinación del rango de linealidad para enzima Protamex	129
ANEXO 3: Determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max}	130
ANEXO 4: Hidrólisis Enzimática de la anchoveta entera	131
ANEXO 5: Grado de hidrólisis en las experiencias del mecanismo de reacción - hipótesis 1	132
ANEXO 6: Grado de hidrólisis en las experiencias del mecanismo de reacción - hipótesis 2	133
ANEXO 7: Grado de hidrólisis en las experiencias del mecanismo de reacción - hipótesis 3	134
ANEXO 8: Grado de conversión a diferentes S_i/K utilizando el modelo de inhibición por sustrato.....	135
ANEXO 9: Grado de conversión utilizando el modelo de inhibición por producto....	136
ANEXO 10: Grado de conversión utilizando el modelo de inactivación térmica.....	137
ANEXO 11: Imágenes del proceso de hidrólisis enzimática.....	138

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la etapa de hidrólisis enzimática de las proteínas de la anchoveta entera, que podrá satisfacer cierta formulación del hidrolizado en la producción de concentrados proteicos de pescados para consumo humano del tipo A y B. El sustrato empleado (anchoveta entera) presentó una composición proximal de 77.65% de humedad, 13.86% de proteínas, 5.24% de grasa y 2.71% de cenizas. La enzima empleada (Protamex™) tuvo una actividad de $369.44 \text{ U} \times \text{mg}^{-1}$, así mismo, sus parámetros cinéticos a las mismas condiciones ambientales fueron: K_m de $11.22 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ y V_{\max} de $0.0116 \text{ g} \times \text{L}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. El desarrollo experimental, en las condiciones ambientales óptimas de la enzima Protamex™ (pH de 7.5 y 55°C), fue un diseño Box-Behnken, con la finalidad de evaluar los efectos de 3 variables, relación enzima sustrato (10 a 60 $\text{UA} \times \text{kg}^{-1}$ proteína cruda), factor de dilución (0.7 a 1.3 kg pescado $\times \text{kg}^{-1}$ agua) y tiempo de reacción (60 a 180 min), sobre el grado de hidrólisis (% GH), la recuperación de la proteína (% RP) y la distribución aparente del peso molecular (PM). Las condiciones óptimas de reacción enzimática son: relación enzima sustrato de 60 $\text{UA} \times \text{kg}^{-1}$ proteína cruda, factor de dilución de 0.7 kg pescado $\times \text{kg}^{-1}$ agua y tiempo de reacción de 90 min, donde se obtiene 16.917% de grado de hidrólisis obtenido, 72.086% de recuperación de proteína del y una peso molecular aparente del péptido obtenido de 11.045 KDa. Seguidamente se estudió la identificación del mecanismo cinético clave, implicado en la hidrólisis de la anchoveta por Protamex™, planteándose tres hipótesis (agotamiento del sustrato, inhibición por producto y la inactivación térmica de la enzima) para explicar la forma típica de la curva de hidrólisis. Se determinó una fuerte inhibición por producto (K_i de $0.608 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ y K'_i de $1.882 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$) lo que explicó satisfactoriamente la forma de la curva de hidrólisis por la disminución notable y progresiva en la velocidad de reacción.

Palabras-claves: Anchoveta entera, enzima Protamex™, concentrado proteico.

ABSTRACT

The purpose of this investigation was to study the enzymatic hydrolysis stage of whole anchovy proteins that could be used to satisfy some hydrolysate formulation in the production of fish protein concentrates type of A and B for human consumption. The substrate used (whole anchovy) presented a proximal composition of 77.65% of humidity, 13.86% of proteins, 5.24% of fat and 2.71% of ashes. The enzyme used (Protamex™) had an activity of 369.44 U×mg⁻¹, and with kinetic parameters under the same environmental conditions were: K_m of 11.22 g×L⁻¹ and a V_{max} of 0.0116 g×L⁻¹×min⁻¹. The experimental plan, under the optimal environmental conditions of the Protamex™ enzyme (pH 7.5 and 55 ° C), was a Box-Behnken design, expecting to evaluate the effects of 3 variables, substrate-enzyme ratio (10 to 60 AU×kg⁻¹ crude protein), dilution factor (0.7 to 1.3 kg fish × kg⁻¹ water) and reaction time (60 to 180 min), on the degree of hydrolysis (% DH), the protein recovery (% PR) and the apparent molecular weight distribution (MW). The optimal conditions are: substrate-enzyme ratio of 60 AU×kg⁻¹ crude protein, dilution factor of 0.7 kg fish×kg⁻¹ water and a reaction time of 90 min, obtaining 16.917% of hydrolysis degree, 72.086% of protein recovery and an apparent molecular weight of the peptide obtained of 11.045 KDa. In the next phase, was studied the identification of the key mechanism involved in the hydrolysis of anchovy by Protamex™, proposing three hypotheses (substrate depletion, inhibition by product and thermal inactivation of the enzyme) to explain the typical shape of the hydrolysis curve. A strong inhibition by product was observed (K_i of 0.608 g×L⁻¹ and K'_i of 1.882 g×L⁻¹) was determined which satisfactorily explained the shape of the hydrolysis curve by the remarkable and progressive decrease in reaction rate.

Key words: whole anchovy, Protamex™ enzyme, protein concentrate.

I. INTRODUCCIÓN

La harina de pescado y el aceite de pescado son industrias de producción en un periodo de transición. Hace quince años, estas industrias se centraban en el aumento de la capacidad de producción; sin embargo, actualmente se está orientando al desarrollo de nuevos productos.

La anchoveta (*Engraulis ringens*) tiene una alta demanda en Perú por las industrias pesqueras, debido a su utilización en la elaboración de harina de pescado, la cual es destinada para un consumo humano indirecto; y en la producción de conservas de pescado, la cual utiliza sólo una fracción de pescado disponible y el resto son sub-productos de bajo valor que se desechan o se utilizan como piensos.

Un proceso enzimático utiliza toda la materia prima, convirtiéndola en ingredientes alimentarios de valor, tales como, extractos de proteínas de pescado, que consisten en un caldo con sabor de buena calidad y una valiosa fracción de aceite de pescado rico en EPA y DHA, así como una fracción de hueso limpio que es adecuado para la obtención de colágeno.

Los concentrados proteicos a partir de especies de pescado y sus partes no procesadas y procesadas, son elaborados con fines de contribuir a la formulación de alimentos de consumo humano directo y se utilizan como alimentos para la salud, alimentos funcionales y nutraceuticos. En Canadá se utiliza como un regulador de las funciones intestinales (Marchbank *et al.*, 2008). En Estados Unidos, en la nutrición deportiva (Nesse *et al.*, 2011); así como en la estabilización de la glucosa en sangre, y control de peso (Guerard *et al.*, 2010). En Reino Unido, como un suplemento dietético (Guerard *et*

al., 2010). Estas aplicaciones son debido a sus múltiples propiedades tecno-funcionales y están siendo incorporados con éxito en diferentes sistemas alimentarios, tales como productos de cereales, productos a base de carne, postres, galletas, entre otros. (Kristinsson y Rasco, 2000).

Estos hidrolizados de proteínas deben cumplir dos características: No estar constituidas sólo por aminoácidos libres, ya que esto las hace hiperosmóticas, provocando secreción intestinal y diarrea (Grimble *et al.*, 1986). No estar constituidos por péptidos de alto peso molecular, ya que genera problemas de alergenicidad y producen cierto amargor en el producto final, que parece estar relacionado con la hidrofobicidad de las cadenas laterales y con la fuente proteica utilizada (Otani *et al.*, 1990). Las consecuencias generadas en ambos casos desaparecen cuando los hidrolizados de proteínas, están constituidos por péptidos de peso molecular inferior a 10,000 Da y superiores a 400 Da (Benítez *et al.*, 2008). Por tanto, el control del proceso de reacción y la caracterización de los hidrolizados en base al tamaño de los péptidos son objetivos importantes en la hidrólisis de proteínas.

En la actualidad, existen investigaciones de producción de hidrolizados de proteínas utilizando varias especies de pescados como *Thunnus albacares* (De Oliveira *et al.*, 2016), *Sardine pilchardus* (García-Moreno *et al.*, 2016), *Capros aper* (Shikha *et al.*, 2016), *Arctoscopus japonicus* (Jang *et al.*, 2016), *Oreochromis niloticus* (Jumardi *et al.*, 2014), *Channa striatus* (Ghassem *et al.*, 2011), *Nemipterus japonicus* (Naqash y Nazeer, 2011), entre otros. Lo que demuestra, que se ha limitado el uso de especies de músculo oscuro, debido a su accesibilidad a la oxidación y de mal sabor en el producto final (Hsu, 2010). También, se ha reportado que estos productos se han obtenido a partir de la

piel (Alemán *et al.*, 2011), cabeza (Bougatef *et al.*, 2008), vísceras (Jai-Ganesh *et al.*, 2011), hígado (Ahn *et al.*, 2010), huesos (Hou *et al.*, 2011), gónadas (Chalamaiah *et al.*, 2011) y músculo. Con estos estudios se ha demostrado que las proteínas pueden ser extraídas de cualquier parte del pescado.

El proceso de obtención de concentrados proteicos de pescado del tipo A y B, para consumo humano directo requiere de operaciones como: hidrólisis enzimática, filtración rotatoria, separación por centrifugación, filtración por membranas, evaporación y secado por atomización. Por esta razón, el objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar la influencia de la relación enzima sustrato, factor de dilución y el tiempo de reacción sobre el grado de hidrólisis, la recuperación de proteína y la distribución aparente del peso molecular de los componentes del hidrolizado proteico de anchoveta entera (*Engraulis ringens*), obteniendo las condiciones óptimas en la etapa más importante del proceso de obtención de un concentrado proteico, la hidrólisis enzimática.

Teniendo como objetivos específicos los siguientes:

- Definir las técnicas de análisis del grado de hidrólisis (Método pH-Stat), recuperación de proteína (Método Kjeldahl) y la distribución aparente del peso molecular (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico).
- Comprobar el rango de linealidad y actividad enzimática de la enzima comercial Protamex™.
- Determinar los parámetros cinéticos de la enzima comercial Protamex™.

- Caracterizar molecularmente los componentes del hidrolizado proteico de anchoveta entera por acción enzimática mediante electroforesis SDS-PAGE.
- Optimizar el proceso de hidrolisis enzimática de anchoveta entera utilizando el diseño Box-Behnken con la finalidad de obtener los mayores valores de grado de hidrolisis y recuperación de proteína, así como, la mayor concentración de péptidos inferiores a 10 KDa.
- Identificar el mecanismo de reacción involucrado en la hidrólisis de proteína de anchoveta entera por acción enzimática.

II. MARCO TEÓRICO

2.1.MATERIA PRIMA

A continuación se detallan las características de la anchoveta peruana, así como, su posición y distribución geográfica, y su composición química.

Nombre Científico: *Engraulis ringens*

Nombre Común: Anchoveta

Nombre en Inglés: Anchovy

Nombre FAO: Anchoveta peruana.

2.1.1. Características de la especie

La anchoveta es una especie pelágica, de talla pequeña, que puede alcanzar hasta los 20 cm. de longitud total. Su cuerpo es alargado poco comprimido, cabeza larga, el labio superior se prolonga en un hocico y sus ojos son muy grandes. Su color varía de azul oscuro a verdoso en la parte dorsal y es plateada en el vientre. Vive en aguas moderadamente frías, con rangos que oscilan entre 16 – 23°C en verano y de 14 – 18°C en invierno. La salinidad puede variar entre 34.5 y 35.1 Unidades Prácticas de Salinidad. La anchoveta tiene hábitos altamente gregarios formando enormes y extensos cardúmenes que en periodos de alta disponibilidad, facilita que sus capturas sean de gran magnitud (FAO, 1985).

2.1.2. Posición y distribución geográfica

La anchoveta es de amplia distribución geográfica en el Pacífico suroriental. Se distribuye desde Punta Aguja (6°00'S), en el norte del Perú, hasta el sur de Chile (44°00'S), y longitudinalmente desde la costa hasta 160 millas mar afuera (FAO, 1985). Su distribución está asociada a la extensión del Sistema de la Corriente de Humboldt, también referido como Sistema de Corrientes Perú-Chile (Montecino *et al.*, 2006), una de las áreas más productivas dentro de los sistemas de corrientes de borde oriental (Mann y Lazier, 2006). Esta alta productividad es favorecida por el ascenso permanente de aguas subsuperficiales ricas en nutrientes que mantiene una alta producción nueva, canalizada vía zooplancton, hacia una de las pesquerías más ricas del mundo como la anchoveta (Bernal *et al.*, 1983; Cushing, 1990; Nixon y Thomas, 2001).

2.1.3. Composición química

En la Cuadro 1 se resume la composición química proximal promedio de la anchoveta (*Engraulis ringens*) fresca crudo.

Cuadro 1: Composición proximal de pescado anchoveta, fresco crudo

Componente	Porcentaje, %
Agua	70.8
Proteínas	19.1
Grasa Total	8.2
Carbohidratos totales	0.0
Cenizas	1.2

Fuente: Tablas peruanas de composición de alimentos, 2009.

2.2.HIDRÓLISIS PROTEICA

La hidrólisis de las proteínas alimentarias para mejorar la aceptabilidad y la estabilidad al almacenamiento de los recursos proteicos, es una tecnología antigua (Adler-Nissen, 1986). Los hidrolizados se pueden definir como proteínas que se descomponen química o enzimáticamente en péptidos de diferentes tamaños y, finalmente, en aminoácidos (Adler-Nissen, 1986). Los hidrolizados proteicos se producen para una amplia variedad de usos en la industria alimentaria, incluyendo sustitutos de leche, suplementos de proteínas, estabilizantes en bebidas y potenciadores de sabor en productos de confitería. Los beneficios de los hidrolizados de proteínas alimentarias para producir ingredientes proteicos funcionales y suplementos nutricionales es una tecnología más reciente, alrededor de la década de 1940, aparecen los primeros hidrolizados proteicos comerciales (Kristinsson y Rasco, 2000).

Los métodos químicos y biológicos son los más utilizados en la hidrólisis de proteínas, siendo la hidrólisis enzimática la que se emplea más frecuentemente, y la más prometedora para el futuro, ya que da como resultado productos de alta funcionalidad y valor nutritivo.

2.2.1. Métodos químicos en la hidrólisis de proteínas

La hidrólisis química de las proteínas se lleva a cabo por escisión de los enlaces peptídicos con la utilización de ácidos o bases. Se han propuesto varios procesos para la hidrólisis ácida o alcalina del pescado (Hale, 1972). Este ha sido el método de elección en el pasado para la industria, principalmente, por su bajo costo y facilidad para llevarla a cabo (Kristinsson y Rasco, 2000). Sin

embargo, existen muchas limitaciones, la hidrólisis química tiende a ser un proceso difícil de controlar y conduce a productos con variable composición química y propiedades funcionales (Skanderby, 1994; Blenford, 1994).

2.2.2. Métodos biológicos en la hidrólisis de proteínas

El proceso de hidrólisis enzimática es más ventajoso que la hidrólisis química, ya que permite el control del grado de hidrólisis y, por consiguiente, el control de las propiedades de los productos resultantes (Kristinsson y Rasco, 2000).

Las enzimas son específicas para un tipo determinado de enlace y, por tanto, no es frecuente la aparición de productos de degradación. En cambio, la poca selectividad de los ataques ácidos y básicos, y su difícil control, conduce inevitablemente a la aparición de productos de degradación que pueden llegar a ser tóxicos (Guadix *et al.*, 2000).

La hidrólisis enzimática transcurre generalmente en el intervalo entre 40 a 60°C y pH entre 4 a 8 (Guadix *et al.*, 2000). Por otro lado, la hidrólisis química, se lleva a cabo a temperaturas y pH extremos, formando productos con un bajo valor nutricional, pobre funcionalidad y restringido para usarse como potenciadores del sabor (Webster *et al.*, 1982; Loffler, 1986).

No se añaden sustancias extrañas en la hidrólisis enzimática. Evidentemente no es así en los procesos de hidrólisis química, ya que la necesaria neutralización posterior eleva considerablemente el contenido en sales (Guadix *et al.*, 2000).

Las enzimas mantienen el valor nutritivo, ya que no producen degradación de los componentes separados, mientras que la hidrólisis alcalina destruye los aminoácidos arginina y cisteína, y la hidrólisis ácida elimina el triptófano y desamina los aminoácidos serina y treonina (Guadix *et al.*, 2000). Es decir, conduce a productos cuya composición química y propiedades funcionales son variables (Skanderby, 1994; Blenford, 1994).

En la hidrólisis enzimática, por la exposición de aminoácidos hidrófobos tales como valina, isoleucina, fenilalanina, triptófano, leucina y tirosina, puede aparecer la amargura en el producto final; sin embargo, se puede limitar su formación mediante el control del grado de hidrólisis o la utilización de enzimas específicas como las *exo-peptidasas* (Pedersen, 1994; Adler-Nissen, 1986).

2.3.HIDRÓLISIS PROTEICA POR ACCIÓN ENZIMÁTICA

En los siguientes sub títulos se definen los términos que involucran el problema de la presente investigación como el sustrato, enzima, la reacción de hidrólisis, su control, etapas y cinética de la hidrólisis proteica por acción enzimática.

2.3.1. Sustrato

Es el material de partida utilizado para la obtención de los hidrolizados proteicos, puede ser de origen animal, vegetal o bacteriano. Para la elección de una fuente proteica adecuada debe tenerse en cuenta el uso que vaya a tener el

hidrolizado, así como el valor agregado del producto final con respecto al sustrato inicial (Guadix *et al.*, 2000).

Así, para la obtención de hidrolizados con propiedades gelificantes y emulsificantes se suelen emplear colágeno y gelatina por su capacidad para formar geles transparentes (Adler-Nissen y Olsen, 1979). También se ha extendido el uso de proteínas de huevo (Lind y Lee, 1983), de carne (Smith y Brekke, 1984), de sangre e incluso de cereales (Sarkki *et al.*, 1979) para este fin.

Cuando la finalidad del hidrolizado es su uso como fuente de nitrógeno, se usan proteínas del pescado (Mackie, 1982). Por lo tanto, en los siguientes subtítulos se limitará la discusión a la obtención de hidrolizados a partir de diferentes partes del pescado (piel, cabeza, músculo, espinas, vísceras, hígado y gónadas) con la finalidad de fundamentar la utilización del pescado entero en nuestra investigación.

2.3.1.1. Hidrolizados proteicos a partir de piel de pescados

La piel de los pescados, un subproducto de la industria pesquera, es una rica fuente de colágeno y gelatina. Existen varios estudios que demuestran el potencial para convertir en hidrolizados de proteína de pescado a partir de desechos de piel de diferentes especies de pescados. Estos incluyen; bacalao (Yang *et al.*, 2008), tilapia (Yang *et al.*, 2009), lenguado (Gimenez *et al.*, 2009), pez gato (Yin *et al.*, 2010), tilapia del Nilo (Ngo *et al.*, 2010), entre otros.

Wasswa *et al.*, (2008) y Wasswa *et al.*, (2007) prepararon hidrolizados de proteínas de la carpa herbívora usando Alcalase y optimizaron las condiciones de hidrólisis usando una metodología de superficie de respuesta. Jian-xin y Zheng (2009) investigaron la hidrólisis enzimática del colágeno de la piel del bacalao y estudiaron la distribución del peso molecular de los hidrolizados. Yin *et al.* (2010) han informado de la piel del pez gato, aislaron hidrolizados de proteínas solubles e insolubles y describieron las propiedades reológicas y funcionales de los hidrolizados de proteínas. Otro estudio publicado por Alemán *et al.* (2011) intentó preparar los hidrolizados de proteínas de las gelatinas de la piel de Atún. Recientemente, Sampath Kumar *et al.* (2012) informaron los hidrolizados proteicos de la piel de dos especies de peces marinos, jurel y corvina, mediante el uso de proteasas gastrointestinales: pepsina, tripsina y α -quimotripsina.

2.3.1.2. Hidrolizados proteicos a partir de cabezas de pescados

Las industrias de procesamiento de pescado generan una cantidad considerable de cabezas como un subproducto rico en proteínas. Los hidrolizados de proteínas a partir de este subproductos se han preparado a partir de diversas especies de pescados; estos incluyen: salmón (Gbogouri *et al.*, 2004), salmón rojo (Sathivel *et al.*, 2005), sable negro (Batista *et al.*, 2010), alacha (Souissi *et al.*, 2007; Bougatef *et al.*, 2010), entre otros.

Sathivel *et al.* (2003) demostraron los hidrolizados de proteína a partir de la cabeza, pescado entero, cuerpo y gónadas de arenque después de una digestión de 75 minutos usando Alcalase como enzima proteolítica e informaron las propiedades funcionales de los hidrolizados. Gbogouri *et al.* (2004) obtuvo hidrolizados de proteínas de cabezas de salmón por tratamiento enzimático con Alcalase, alcanzando diversos grados de hidrólisis (11.5 – 17.5%) mediante la metodología de superficie de respuesta donde varió los niveles de temperatura, pH y relación enzima-sustrato.

Un estudio realizado por Sathivel *et al.* (2005) reportaron los hidrolizados proteicos de la cabeza del salmón rojo y estudiaron los efectos de diferentes enzimas proteolíticas: Alcalase, Flavourzyme, Palatase y Neutrase; y diferentes tiempos de reacción (25, 50 y 75 min) sobre las propiedades funcionales y nutricionales. Bougatef *et al.* (2008) obtuvieron hidrolizados proteicos de cabezas y vísceras de alacha por tratamiento con Alcalase, quimotripsina, preparaciones enzimáticas brutas de *Bacillus licheniformis* y *Aspergillus clavatus* y extracto de enzima cruda de vísceras de sardina.

Otro estudio realizado por Souissi *et al.* (2007) ha descrito hidrolizados de proteínas de pescado con diferentes grados de hidrólisis (6.62, 9.31 y 10.16 %) a partir de cabezas y vísceras de alacha por tratamiento con Alcalase.

2.3.1.3. Hidrolizados proteicos a partir de músculo de pescados

Los músculos oscuros ricos en proteínas de los peces tienen usos limitados debido a su accesibilidad a la oxidación y al sabor desagradable. En su mayoría se transforman en productos de bajo valor de mercado. Por lo tanto, la conversión de estos materiales ricos en proteínas en hidrolizados para su posterior utilización puede producir productos de gran valor (Hsu, 2010).

Varios hidrolizados de proteínas se producen usando varias proteínas de músculo de peces de varias especies, tales como salmón atlántico (Kristinsson y Rasco, 2000; Nakajima *et al.*, 2009), merluza del Pacífico Norte (Pacheco-Aguilar *et al.*, 2008), tilapia (Raghavan y Kristinsson, 2008), atún (Hsu, 2010), barracuda (Rajaram y Nazeer, 2010), entre otros.

Se preparó hidrolizados proteicos por atomización a partir de músculo de tilapia negra y se evaluó su calidad nutricional (Abdul-Hamid *et al.*, 2002). Otro estudio realizado por Wu *et al.* (2003) describió los hidrolizados proteicos del músculo de caballa por un proceso autolítico e hidrólisis acelerada con una enzima comercial, la proteasa N, e investigó los cambios en los niveles y composiciones de aminoácidos y péptidos pequeños durante la hidrólisis. Candido y Sgarbieri (2003) hidrolizaron enzimáticamente las proteínas miofibrilares de tilapia del Nilo en hidrolizados de proteínas con diferentes grados de hidrólisis (2.5, 3.5, 7.0, 9.0, 14.0 y 25.0%) usando Flavourzyme. En un estudio

realizado por Theodore y Kristinsson (2007), la proteína del músculo de bagre fue hidrolizado y reportó un 5%, 15% y 30% de hidrólisis usando Protamex. Cinq-Mars y Li-Chan (2007) describieron el hidrolizado de filete de merluza del Pacífico usando Protamex bajo diversas condiciones de pH, tiempo de hidrólisis y relación enzima sustrato. Klompong *et al.* (2009) obtuvieron hidrolizados de proteínas de carnes de raya amarilla con un 15% de grado hidrólisis usando Alcalase y Flavourzyme siguiendo el método pH-Stat. Choi *et al.*, (2009) han preparado hidrolizados de proteínas a partir de músculo de corvina congelada usando Alcalase, Neutrase, Protamex y Flavourzyme.

2.3.1.4. Hidrolizados proteicos a partir de vísceras de pescados

Las vísceras de pescado generadas durante el procesamiento son una fuente potencial de proteína que puede utilizarse como materia prima para la producción de hidrolizados de proteínas, que pueden tener algunas propiedades excepcionales para diversas aplicaciones industriales. En los últimos tiempos, se han hecho varios intentos para la producción de hidrolizados de proteínas a partir de vísceras de peces utilizando varias enzimas proteolíticas (Batista *et al.*, 2010; Bhaskar *et al.*, 2008; Bougatef *et al.*, 2010; Hathwar *et al.*, 2011, Ovissipour *et al.*, 2009, Souissi *et al.*, 2007).

Aspmo *et al.*, (2005) estudiaron la solubilización de proteínas viscerales de bacalao a pH natural de sustrato usando enzimas endógenas solas o en combinación con una de siete preparaciones comerciales de proteasa

diferentes: Alcalase, Neutrase, Protamex, Papaína, Bromelina, Actinidina y una mezcla de proteasa vegetal. Liceaga-Gesualdo y Li-Chan (1999) describieron el hidrolizado de proteína del arenque usando una preparación de endopeptidasa de *Bacillus licheniformis* e informaron el grado de hidrólisis y propiedades funcionales de los hidrolizados de proteínas. Guerard *et al.* (2002) produjeron hidrolizados proteicos a partir de estómago de atunes de aleta amarilla por una proteasa comercial umamizyme.

2.3.1.5. Hidrolizados proteicos a partir de hígado de pescados

Je *et al.* (2009) informó de hidrolizados de proteínas del hígado de barrilete, un subproducto de pescado que se utiliza para producir harina de pescado y piensos o se descarta directamente como desechos de procesamiento, mediante hidrólisis enzimática utilizando proteasas comerciales como Flavourzyme, Alcalase, Protamex y Neutrase. Otro estudio realizado por Ahn *et al.* (2010) ha informado hidrolizados de proteínas de hígado de atún por hidrólisis enzimática utilizando diversas proteasas como Alcalase, Neutrase y Protamex. Los hidrolizados de proteínas se pueden utilizar como productos de valor añadido, que se aplican ampliamente para mejorar y mejorar las propiedades funcionales y nutricionales de las proteínas.

2.3.1.6. Hidrolizados proteicos a partir de espinas de pescados

La espina dorsal del pescado es una de las partes importantes de los desechos de procesamiento de pescado, y contiene alrededor del 30%

de proteínas (Je *et al.*, 2007). Por lo tanto, pocos investigadores intentaron preparar hidrolizados proteicos a partir de las proteínas de la columna vertebral de peces subutilizados con el fin de hacer productos de valor agregado. Sumaya-Martinez *et al.*, (2005) estudiaron los parámetros de hidrólisis para la producción de hidrolizados de proteína de pescado a partir de la carpa dorada. Un estudio realizado por Je *et al.* (2007) informaron los hidrolizados proteicos de la proteína del esqueleto del atún usando diferentes proteasas tales como Alcalase, α -quimotripsina, Neutrased, Papaína, Pepsina y Tripsina. Slizyte *et al.* (2009) realizaron una serie de ensayos de hidrólisis utilizando espinas dorsales del bacalao que fueron inicialmente frescos o congelados y posteriormente hidrolizados a diferentes tiempos de reacción (10, 25, 45 y 60 min) y evaluaron cómo el almacenamiento y la preparación afectaban en el rendimiento, funcionalidad, bioactividad y propiedades antioxidantes de los hidrolizados.

2.3.1.7. Hidrolizados proteicos a partir de gónadas de pescados

Las gónadas de varias especies de pescados están subutilizadas y se consideran subproductos en diferentes partes del mundo, especialmente en los países en desarrollo. No se informó mucho sobre la utilización de gónadas de pescado, a excepción de pocos productos de valor añadido (Bledsoe *et al.*, 2003; Chalamaiah *et al.*, 2013). Las gónadas de pescado contienen una cantidad considerable de proteínas. Con el fin de utilizar esta fuente de proteína subutilizada a partir de gónadas de pescado, se prepararon hidrolizados de proteínas de peces subutilizadas como

mrigal (*Cirrhinus mrigala*) por acción de Alcalase y Papaína como enzimas proteolíticas (Chalamaiah *et al.*, 2010).

2.3.2. Enzimas proteolíticas

Las enzimas son catalizadores bioquímicos vitales para los seres vivos, ya que aceleran las reacciones químicas entre los componentes orgánicos dentro de las células que de otro modo tomaría un tiempo muy largo para completar. En la ciencia y la tecnología alimentaria se explotan las enzimas para realizar las funciones deseadas en el procesamiento y para facilitar la conversión de las materias primas en productos alimenticios de mayor calidad (Richardson y Hyslop, 1984). Las enzimas lo hacen posible porque el sitio activo de una enzima es altamente específico para ciertos sustratos (Kristinsson y Rasco, 2000).

Las enzimas utilizadas por la industria y en la investigación alimentaria son predominantemente hidrolasas, la mayoría de las cuales son carbohidrasas, seguidas de proteasas y lipasas. Las proteasas están entre las enzimas mejor caracterizadas. Las preparaciones de enzimas proteolíticas son económicamente el grupo más importante de enzimas y su uso está bien establecido en la industria alimentaria (Godfrey y Reichelt, 1983).

Las proteasas se clasifican según: su origen (animal, vegetal, microbiano), su acción catalítica (endo-proteinasas y exo-peptidasas) y la naturaleza del sitio catalítico (las endo-proteinasas: serina-, cisteína-, metalo-, o aspartato-

proteinasas; y las exo-peptidasas: amino-, carboxi-, o di-peptidasas) (Adler-Nissen, 1986; Lahl y Braun, 1994; Guadix *et al.*, 2000).

Las proteasas se caracterizan por su acción catalítica en endo-proteinasas o exo-peptidasas. Las endo-proteinasas escinden los enlaces peptídicos dentro de las moléculas de proteína, usualmente en residuos específicos para producir péptidos relativamente grandes. Las exo-peptidasas separan los aminoácidos del extremo N (amino-peptidasas) o del extremo C (carboxi-peptidasas) mediante la hidrólisis de los enlaces peptídicos terminales. En la hidrólisis de las proteínas alimentarias, las endo-proteinasas siempre se utilizan, pero ocasionalmente las endo-proteinasas se combinan con exo-peptidasas para lograr una degradación más completa (Adler-Nissen, 1986).

Las primeras enzimas proteolíticas utilizadas en la industria alimentaria fueron proteasas pancreáticas de origen animal, si bien cada vez están adquiriendo mayor importancia las de origen bacteriano o fúngico (Guadix *et al.*, 2000). En la Cuadro 2 se presentan algunas de las proteasas comerciales de grado alimentario disponibles en el mercado y se indica la especificidad de parte de ellas. Los preparados enzimáticos suelen ser mezclas de estas enzimas y normalmente se venden en estado líquido o como polvos.

Cuadro 2: Proteasas para la producción de hidrolizados de proteínas alimentarias

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

Fuente: Nielsen, P. M. (2009)

2.3.3. Reacción de la hidrólisis enzimática

La reacción catalizada por la proteasa divide un enlace peptídico en la proteína como se ilustra en la Figura 1.

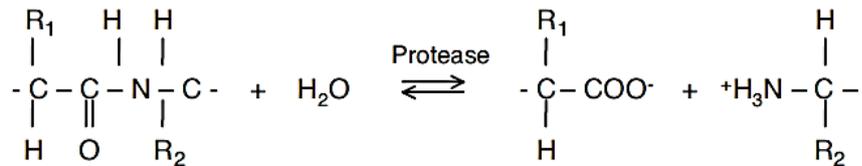
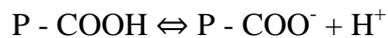


Figura 1: Esquema de la reacción catalizada por la proteasa (pH ~ 6).

La proteasa actúa sobre el enlace peptídico, rompiéndolo, y liberando el grupo amino y el grupo carboxilo, como se aprecia en la Figura 1.

Los grupos amino y carboxilos formados tras la hidrólisis pueden estar parcialmente ionizados, dependiendo del pH del proceso de hidrólisis, y según los siguientes equilibrios:



Se estiman que los valores de pK a 25°C para los grupos -COOH y +H₃N- en polipéptidos están comprendidos entre 3.1 a 3.6 y 7.5 a 7.8, respectivamente (Steinhardt y Beychok 1964; Rupley, 1967). Por lo que para pH < 3.1 - 3.6, el grupo ácido estará parcialmente disociado y el grupo amino totalmente protonado. Si se deja incontrolado el pH en esta zona aumenta rápidamente. Si

se trabaja a pH > 7.5 - 7.8, el grupo carboxilo estará totalmente disociado y el amino parcialmente protonado, lo que conlleva una bajada continua del pH.

Para seguir la cinética de reacción y obtener una medida de la extensión de la degradación hidrolítica, se emplea un parámetro denominado grado de hidrólisis. En principio, existen varios métodos de control, pero en condiciones prácticas industriales hay pocos (Petersen, 1994). El grado de la hidrólisis es más comúnmente usado para describir la hidrólisis de proteínas alimentarias. El grado de hidrólisis demuestra tanto teórica como empíricamente que cuatro variables de procesamiento: sustrato, relación enzima sustrato, temperatura y tiempo, pueden dejarse sin control, siempre que se controle el grado de hidrólisis (Adler-Nissen, 1984). De esto, es obvio que el grado de hidrólisis es un método muy simple y rápido de medir el grado de ruptura de las proteínas.

El grado de hidrólisis se define por el porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados:

$$\text{Grado de Hidrólisis (GH) \%} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de enlaces peptídicos escindidos}}{\text{n}^\circ \text{ total de enlaces peptídicos}} \times 100$$

Ecuación 1: Definición del grado de hidrólisis.

2.3.4. Control de la reacción de hidrólisis enzimática

Varios aspectos de esta reacción se utilizan en el control del grado de hidrólisis. Algunos están relacionados con la formación de los grupos amino, otros con la acidez de los péptidos o con el cambio en otras propiedades de los

péptidos resultantes. La Cuadro 3 muestra una visión general de los métodos que pueden usarse para monitorear el grado de hidrólisis.

Cuadro 3: Métodos para la medición del grado de hidrólisis

Método	Principio del método	Referencia
<i>En base a la formación del grupo amino</i>		
OPA	Orto-ftalaldehído reacciona con grupos amino primarios para formar un compuesto de color detectable	Nielsen, Pedersen y Dambmann, 2001.
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico reacciona con grupos amino para formar un compuesto de color detectable	Adler-Nissen, 1979; Adler-Nissen, 1986.
Ninhidrina	Ninhidrina reacciona con grupos amino para formar un compuesto de color detectable	Adler-Nissen, 1986.
Titulación con formol	Titulación de grupos amino con formaldehído	
<i>En base a la acidez</i>		
pH – Stat	Mantener el pH constante durante la hidrólisis; la cantidad de titulante es equivalente al grado de hidrólisis	Adler-Nissen, 1986.
Titulación a pH alcalino	Titular el ácido formado durante la hidrólisis (a pH > 5.5) hasta pH 8.0	
Cambio en el pH	Seguir el pH durante la hidrólisis	Mozerky y Panettieri, 1983.
<i>En base a otras propiedades</i>		
Osmometría	Medición de la depresión del punto de congelación, que se correlaciona con el grado de hidrólisis	Adler-Nissen, 1986.
Brix	Medición del índice de refracción, que se correlaciona con la materia seca soluble	Adler-Nissen, 1986.
Nitrógeno soluble	Nitrógeno soluble	Margot <i>et al.</i> , 1994.
Índice ácido tricloroacético	Cantidad de péptidos solubles en ácido tricloroacético (por encima de un cierto peso molecular los péptidos precipitan)	Adler-Nissen, 1986.
Cadena peptídica	Método de HPLC basado en cromatografía de permeación en gel	
Viscosidad	Seguir el cambio de viscosidad durante la hidrólisis	Adler-Nissen, 1986.

Fuente: Nielsen, P. M. (2009)

Se han estudiado minuciosamente dos métodos para medir el grado de hidrólisis y se ha demostrado que son satisfactorios, la técnica del pH – Stat y la osmometría.

2.3.4.1. Determinación del grado de hidrólisis

El método pH-Stat es más comúnmente usado y más útil para aplicaciones industriales (Adler-Nissen, 1986; Kristinsson y Rasco, 2000). El principio detrás del método pH – Stat es relativamente simple y se basa en mantener un pH constante durante la reacción. El grado de hidrólisis se calcula a partir del volumen y la normalidad de la base o del ácido utilizado para mantener un pH constante.

El grado de hidrólisis puede ser determinado según la ecuación 2:

$$GH (\%) = \frac{B \cdot N \cdot 100}{\alpha \cdot M_p \cdot h_{tot}}$$

Ecuación 2: Determinación del grado de hidrólisis (GH)

Dónde; B = consumo básico en mL (o ácido en caso de proteasas ácidas), N = normalidad de la base (o ácido), α = grado medio de disociación de los grupos -NH o -COOH, M_p = masa de proteína en gramos (% N x 6.25).

El grado de disociación se obtiene mediante la ecuación 3:

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH} - \text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}}}$$

Ecuación 3: Determinación del grado medio de disociación de los grupos α -NH.

La técnica del grado de hidrólisis es válida cuando la hidrólisis se realiza a un pH por encima del pK del grupo α -NH (para hidrólisis a pH neutro o alcalino). Bajo estas condiciones, la reacción dará como resultado una liberación neta de protones (H^+) cuando los enlaces peptídicos se escinden, y el consumo base es proporcional al número de enlaces peptídicos divididos (Adler-Nissen, 1977). A partir de pH 6.5, la disociación del grupo α -NH protonado se hace significativa. Por lo tanto, es importante conocer los valores de pK de los grupos α -NH, tanto para determinar el pH de la reacción como para calcular correctamente la constante de disociación. El valor pK varía significativamente con la temperatura. Los valores de pK a diferentes temperaturas se pueden calcular de acuerdo la ecuación 4 según Steinhardt y Beychok (1964).

$$\text{pK} = 7.8 + \frac{298 - T}{298 \cdot T} \cdot 2400$$

Ecuación 4: Determinación del valor pK.

Donde T es la temperatura en Kelvin.

El método pH – Stat, sin embargo, tiene algunas limitaciones. El uso de pH – Stat como medio de control sólo es práctico fuera del intervalo aproximado de pH de 3 a 7 (Petersen, 1994). Esto debe tenerse en cuenta al decidir los valores de pH para la reacción de hidrólisis. Dentro de este rango de pH, el control del proceso puede depender de otros métodos. Por lo tanto, el método pH – Stat para la determinación del grado de hidrólisis es útil principalmente en condiciones alcalinas.

Algunos métodos de análisis usan la correlación entre el grado de hidrólisis y las propiedades de la propia proteína. Por ejemplo, a los cambios de viscosidad, normalmente la viscosidad se reduce a la hidrólisis de la proteína, la proteína se vuelve más soluble, que puede ser medida por el nitrógeno soluble, el índice de ácido tricloroacético y brix (Nielsen, 2009). Estas características son muy importantes para muchas de las aplicaciones, pero el uso de cambios en las propiedades físicas para el control de procesos es bastante impreciso y sólo puede servir como métodos indicativos. Silvestre (1997), revisó los métodos para el análisis de hidrolizados de proteínas. En esta revisión, se puede encontrar más información sobre el potencial y las limitaciones de los diferentes métodos.

2.3.4.2. Distribución aparente del peso molecular

La distribución de tamaños de los péptidos de un hidrolizado puede ser útil para predecir la capacidad antigénica del mismo así como para

mostrar diferencias en la actuación de distintos pretratamientos del sustrato o enzimas utilizadas. Normalmente se utilizan métodos cromatográficos o electroforéticos para este fin.

Una vez determinado el grado de hidrólisis, puede estimarse la distribución y el promedio de la longitud de la cadena peptídica de los hidrolizados, asumiendo que todos los hidrolizados son solubles (Benítez *et al.*, 2008; Adler-Nissen J., 1986).

La longitud de la cadena peptídica está relacionada con el promedio del peso molecular de los péptidos en los hidrolizados. Sin embargo, los hidrolizados con un promedio de la longitud de la cadena similar podrían tener péptidos de distribuciones de peso molecular sustancialmente diferente.

La electroforesis en gel, SDS-PAGE ha sido la técnica más utilizada para la caracterización de hidrolizados y proteínas (Desphande y Nielsen, 1987, Leaver y Thomson 1993, Perea *et al.*, 1993, Parrado *et al.*, 1993) a pesar de sus limitaciones en la separación de péptidos de bajo peso molecular.

Mención especial merecen las investigaciones realizadas por Lemieux y Amiot (1990) en este campo, quienes manifestaron el desarrollo de nuevas técnicas capaces de separar y cuantificar los péptidos de un peso molecular inferiores a 1 KDa, especialmente si el hidrolizado se va a

utilizar en la formulación de dietas enterales, en cuyo caso debe estar constituido fundamentalmente por di-péptidos y tri-péptidos.

2.3.5. Etapas de la hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de proteínas es un proceso que transcurre a través de un conjunto de etapas en serie: proteínas, proteosomas, peptonas, péptidos y aminoácidos (Guadix *et al.*, 2000). Se trata de un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio, lo que da una gran complejidad a este tipo de procesos (Benítez *et al.*, 2008).

Se propone un proceso de hidrólisis constituido por tres reacciones consecutivas: (i) la formación del complejo enzima-sustrato, (ii) la escisión del enlace peptídico para liberar uno de los dos péptidos y (iii) un ataque nucleofílico de una molécula de agua para separar el péptido restante de la enzima (Adler-Nissen, 1984; Svendsen, 1976). El proceso puede reiniciarse sobre los dos nuevos péptidos o sobre solo uno de ellos. Estos tres pasos se representan esquemáticamente en la figura 2.



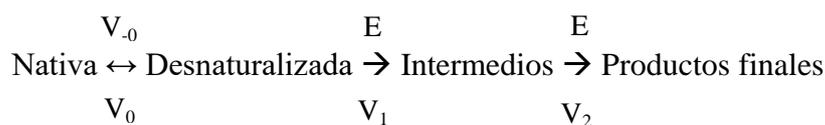
E: enzima, S: sustrato, P, P': péptidos resultantes, k_x : constante velocidad de reacción.

**Figura 2: Mecanismo catalítico de una proteasa.
Fuente: (Adler-Nissen, 1993).**

Este complejo enzima-sustrato puede disociarse de nuevo a sustrato reactivo y enzima libre, o liberar enzima y moléculas de producto. Es decir, la cinética clásica de Michaelis-Menten se aplica (Adler-Nissen, 1986). El mecanismo

generalmente aceptado para las proteasas indica que la segunda etapa es la etapa determinante de la velocidad, por lo que 'k₂' determina principalmente la velocidad de reacción global y K_m es más o menos igual a la verdadera disociación constante. Sin embargo, este mecanismo simple no trata la cuestión detallada de cómo la enzima y el sustrato están unidos o qué configuraciones moleculares conducen a la formación del producto.

Para la hidrólisis de proteína, la unión del complejo enzima-sustrato es esencial. En el caso de proteínas globulares, la mayoría de los enlaces peptídicos están localizados en el interior de la proteína y no son accesibles para la enzima, por esto, se considera que para proteínas globulares es necesario efectuar la desnaturalización de la proteínas antes de proceder a hidrolizarla, ya que después de la desnaturalización estarán expuestos más enlaces peptídicos (Benítez *et al.*, 2008). Es decir, solo las moléculas no plegadas son susceptibles a degradación por proteasas, como se representa esquemáticamente en la figura 3.



V: velocidad de reacción, E: enzima

**Figura 3: Teoría de Linderstrom-Lang.
Fuente: (Whitaker, 1994).**

Si la velocidad de desnaturalización ($V_0 = V_{+0} - V_{-0}$) es menor que V_1 , la etapa de desnaturalización es la etapa limitante de la velocidad de hidrólisis y cada proteína desnaturalizada será rápidamente hidrolizada hasta los productos

finales. El hidrolizado resultante, además de contener ambas proteínas intactas, contendrá los productos finales, aunque serán deficientes en péptidos de tamaños intermedios. Este tipo de reacción está designada como una reacción “en etapas sucesivas”. Si, además, la desnaturalización de la proteína es más rápida que la hidrólisis ($V_1 < V_0$), las moléculas de la proteína serán degradadas a intermedios pero posteriormente son degradadas lentamente en productos finales. Este tipo de reacción es llamada de “cremallera”, obteniéndose un hidrolizado que contiene principalmente péptidos de tamaño intermedio. Ambos mecanismos de hidrólisis están implicados en la mayoría de las reacciones proteolíticas (Adler-Nissen, 1986; Benítez *et al.*, 2008).

Si la proteína se desnaturaliza irreversiblemente antes de la hidrólisis, el número de enlaces de péptidos disponibles se incrementa notablemente y la degradación de la proteína debería proceder de acuerdo con un tipo de reacción “cremallera”. Para estas proteínas desnaturalizadas otros factores tales como la disminución de la solubilidad media influyen en la velocidad de reacción inicial (Adler-Nissen, 1986).

La hidrólisis enzimática de las proteínas es un proceso complejo debido a varios enlaces peptídicos y a su accesibilidad específica a las reacciones enzimáticas (Linder *et al.*, 1995). Las condiciones ambientales como la temperatura y el pH es otro factor que afecta al perfil peptídico del producto final. Tanto la temperatura como el pH pueden afectar en gran medida la cinética de la reacción enzimática, y el efecto de estos factores es diferente para cada enzima (Kristinsson y Rasco, 2000).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del trabajo de investigación, fueron utilizados los materiales y métodos que se describen a continuación.

3.1.LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en los siguientes ambientes de la Universidad Nacional del Santa:

- Laboratorio de Química Orgánica de la E.A.P. de Agroindustria.
- Laboratorio de Análisis y Composición de Productos Agroindustriales de la E.A.P. de Agroindustria.

Asimismo, se prestaron los ambientes de los siguientes laboratorios especializados para la realización de análisis específicos como determinación de proteína en muestra líquida y corrida electroforética:

- Laboratorio de análisis físico-químicos de ABBSER, Chimbote, Ancash.
- Laboratorio de Investigación de Escaicyt de Escacorp SAC, Trujillo, La Libertad.

3.2.MATERIALES

3.2.1. Materia prima

Se utilizó un lote de 10 kg de anchoveta (*Engraulis ringens*), proporcionados por la empresa de procesamiento de pescado “PescArt (Chimbote, Perú)” en octubre del 2016. Para asegurar la frescura de la materia prima, el pescado

entero, se lavó con abundante agua, y se congeló a -18°C en bolsas plásticas de polietileno lineal de baja densidad con sello hermético en porciones de 0.5 kg (Figura 4). Antes del proceso de hidrólisis enzimática, la porción de materia prima se descongeló 10 horas previas a su utilización, en el refrigerador a 4°C .



Figura 4: Almacenamiento temporal de la anchoveta entera.

3.2.2. Enzima

En el proceso de hidrólisis proteica de anchoveta entera, se utilizó la proteasa comercial ProtamexTM (CE 3.4.21.62/3.4.24.28) como se aprecia en la figura 5, una mezcla de serina y metalo endopeptidasas de la empresa Novozymes producidas por las bacterias *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* con una actividad enzimática declarada de $1.7 \text{ UA}\times\text{g}^{-1}$, densidad de $1100 \text{ kg}\times\text{m}^{-3}$. Las condiciones de trabajo óptimas para la ProtamexTM reportadas por Novozymes son pH 5.5 - 7.5 a una temperatura 35 -

60°C; su temperatura de inactivación es de 85°C durante 10 minutos (Novozymes A/S, 1998).

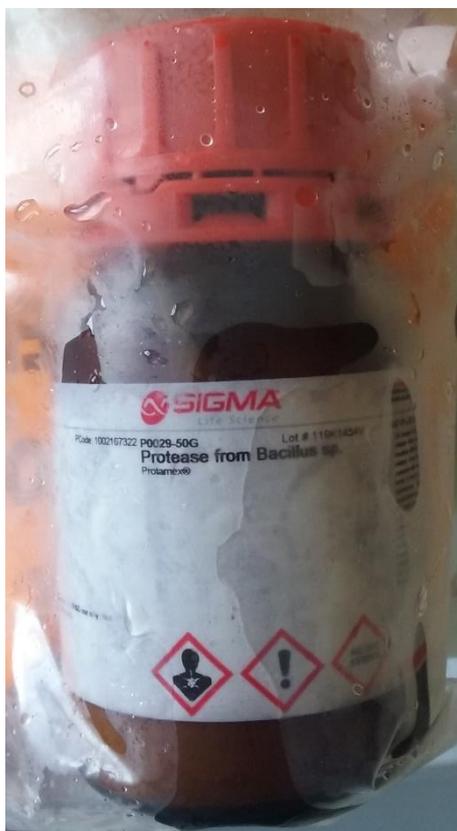


Figura 5: Envase de la proteasa de Bacillus sp. “Protamex”.

La preparación de la proteasa de Bacillus utilizada en este estudio contiene subtilisina, un serineprotease con una amplia gama de especificidad para enlaces peptídicos, y un neutral metallo-peptidasa de la familia termolisina. Iones metálicos tales como zinc y calcio han sido reportados para trabajar como cofactores de la termolisina, siendo esencial para la actividad enzimática y la estabilidad estructural (Fernández *et al.*, 2016; Coolbear *et al.*, 1992; Latt *et al.*, 1969). Además, los iones de potasio parecen funcionar como cofactores, o al menos como activadores, para el neutro metalo-peptidasa presente en Protamex. (Fernández *et al.*, 2016).

3.3.MÉTODOS

Inicialmente, se determinó la actividad enzimática y los parámetros cinéticos de la enzima comercial Protamex™. Luego, se determinó la composición química de la anchoveta entera. Después, se realizaron los experimentos de hidrólisis enzimáticas de acuerdo con la Cuadro 5 del diseño experimental a través de la metodología de superficie de respuesta, con el fin de obtener el mayor grado de hidrólisis, la mayor recuperación de proteínas y la más alta concentración de péptidos inferiores a 10 KDa.

3.3.1. Determinación de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica fue determinada según el método descrito por Cupp-Enyard, C. (2008). En este ensayo, la caseína actúa como sustrato. Cuando la proteasa que estamos analizando digiere caseína, el aminoácido tirosina se libera junto con otros aminoácidos y fragmentos peptídicos. El reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu, reacciona principalmente con tirosina libre para producir un cromóforo de color azul, como se puede apreciar en la Figura 6, que es cuantificable y se mide como un valor de absorbancia en el espectrofotómetro. Los valores de absorbancia generados por la actividad de la proteasa se comparan con una curva estándar, que se genera haciendo reaccionar cantidades conocidas de tirosina con el reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu para correlacionar los cambios en la absorbancia con la cantidad de tirosina en micromoles. A partir de la curva estándar se puede determinar la actividad de las muestras de proteasas en términos de unidades, que es la cantidad en micromoles equivalentes de tirosina liberados de la caseína por cada minuto a pH 7.5 y 37°C.

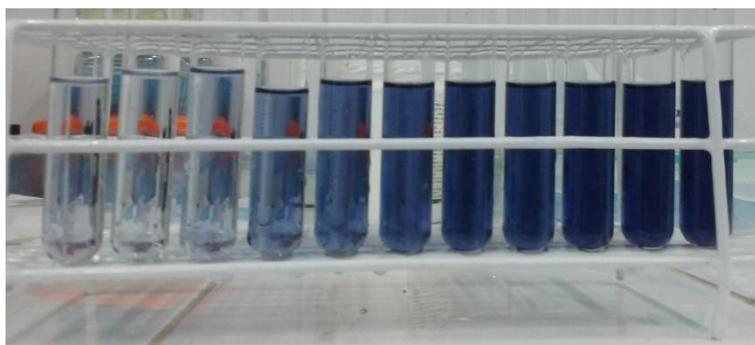


Figura 6: Disminución gradual de la concentración de tirosina por acción de la enzima Protamex.

1. Para esta metodología, se utilizó tubos de ensayo que contengan aproximadamente 15 mL. Para cada dilución enzimática, se necesitaron 4 tubos de ensayo. Se utilizó un tubo como blanco, y otros tres tubos para ensayar la actividad de tres diluciones de la proteasa. Tres diluciones son útiles cuando se comprueban los cálculos finales entre sí.
 - 1.1. A cada conjunto de cuatro tubos de ensayo, se añadió 5 mL de solución de caseína al 0.65% (p/v). Se dejó equilibrar en un baño maría Electronic Thermo Stat BTR-65 a 37°C durante unos 5 minutos.
 - 1.2. Se añadió volúmenes variables de la solución enzimática: 1 mL, 0.7 mL y 0.5 mL a tres de los tubos de ensayo, pero no al blanco. Se mezcló en remolino por medio de un agitador de tubos Barnstead Thermolyne M37615 y se dejó incubar a 37°C durante 10 minutos. La actividad proteolítica y consecuente liberación de tirosina durante este

tiempo de incubación es lo que se medirá y se comparará entre muestras de ensayo.

2. Después de esta incubación de 10 minutos, se añadió 5 mL del reactivo de ácido tricloroacético 110 mM a cada tubo para detener la reacción. Seguidamente, se añadió un volumen de solución enzimática a cada tubo, incluso en el blanco, de modo que el volumen final de la solución de enzima en cada tubo sea de 1 mL. Esto se hace para tener en cuenta el valor de absorbancia de la propia enzima y para asegurar que el volumen final en cada tubo sea igual. Se incubó las soluciones a 37°C durante 30 minutos.
3. Durante esta incubación de 30 minutos, se realizaron las diluciones estándar de tirosina. Se utilizó 6 tubos de ensayo con capacidad de 10 mL. A los seis tubos de ensayo, se añadió la solución de tirosina libre a 1.1 mM con los siguientes volúmenes en mL: 0.05; 0.10; 0.20; 0.40; 0.50. No se agregó ningún estándar de tirosina libre al blanco. Seguidamente, se añadió un volumen de agua destilada a cada tubo de ensayo para completar un volumen de 2 mL.
4. Después de la incubación de 30 minutos, se filtró cada una de las soluciones de prueba y el blanco utilizando un filtro de jeringa. Se requiere filtración para eliminar cualquier insoluble de las muestras.

- 4.1. Se tomó 2 mL del filtrado provenientes de las soluciones de prueba y blanco, a nuevos tubos de ensayo de 10 mL de capacidad.
- 4.2. A todos los tubos que contienen las soluciones de prueba, solución estándar de tirosina y blanco, se añadió 5 mL de la solución de carbonato de sodio a 500 mM. Para obtener mejores resultados, se añadió 1 mL del reactivo del fenol según Folin-Ciocalteu a 0.5 M inmediatamente después.
- 4.3. Se mezcló los tubos de ensayos mediante el agitador de tubos y se incubaron a 37°C durante 30 minutos en el baño maría.
5. Después de la incubación, debe notarse que los estándares tienen una graduación de color correlacionando con la cantidad de tirosina añadida (Figura 6). A mayor concentración de tirosina aparecen más oscuras.
 - 5.1. Se filtró cada blanco, estándar de tirosina y solución de prueba; usando un filtro de jeringa, en las celdas de vidrio.
 - 5.2. Finalmente, se registró la absorbancia a 660 nm de cada solución de prueba, estándar y blanco en el espectrofotómetro UV/VISIBLE: Unico SR-2800.

3.3.2. Determinación de los parámetros cinéticos

Se usó caseína en los intervalos de concentración 8.00 – 17.50 g/L, para determinar los parámetros cinéticos de la enzima, utilizándose una solución enzimática de 1:2000 de Protamex. La constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}) se determinaron como los valores absolutos recíprocos de los interceptos en el eje 'x' (concentración de caseína) y en el eje 'y' (velocidad de reacción) de la curva de regresión lineal (Lineweaver y Burk, 1934).

1. Para esta metodología, se utilizó tubos de ensayo que contengan aproximadamente 15 mL. Para cada concentración de caseína que será probada, se necesitan 3 tubos de ensayo. Se utilizó un tubo para el blanco, y otros dos tubos para ensayar la misma dilución de caseína. Dos repeticiones son útiles cuando se comprueban los cálculos finales entre sí.
2. En cada serie de tubos se añadió caseína a una concentración diferente. La preparación de una gama de soluciones de caseína entre 8.00 – 17.50 mg.mL⁻¹.

**Cuadro 4: Preparación de las concentraciones de caseína para la
determinación de los parámetros cinéticos ' K_m ' y ' $V_{máx}$ '**

# Experiencia	Solución (A), mL	Solución (B), mL	Concentración S_0 , g/L
1	0.80	4.20	8.00
2	0.90	4.10	9.00
3	1.00	4.00	10.00
4	1.25	3.75	12.50
5	1.50	3.50	15.00
6	1.75	3.25	17.50

Solución (A): Solución sustrato caseína 20 g/L

Solución (B): Buffer fosfato de potasio a 50 mM, pH 7.5.

3. Se preparó las mezclas de ensayo que se indican en la Cuadro 4.

La mezcla de ensayo se dejó equilibrar en un baño maría a 37°C durante unos 5 minutos.

3.1.Después de esta incubación de 5 minutos, se añadió 1 mL de la solución enzimática 1:2000 a los tubos de ensayo, pero no al blanco. Se mezcló en remolino por medio de un agitador de tubos y se dejó incubar a 37°C durante 10 minutos.

4. Después de esta incubación de 10 minutos, se añadió 5 mL del reactivo de ácido tricloroacético 110 mM a cada tubo para detener la reacción. Seguidamente, se añadió 1 mL de solución enzimática 1:2000 en el blanco, de modo que el volumen final de la solución de enzima en cada tubo es de 1 mL. Posteriormente, se incubó las soluciones a 37°C durante 30 minutos, y se sigue el

mismo procedimiento experimental que se detalló en la determinación de la actividad proteolítica a partir del inciso 4.

3.3.3. Composición química proximal de la anchoveta entera

Se obtiene a través de análisis de humedad (Método AOAC 952.08 - 2005), ceniza (Método AOAC 938.08 - 2005), proteína cruda (Método AOAC 940.25 - 2005) y grasa cruda (Método AOAC 948.15 - 2005), realizado por triplicado.

3.3.4. Hidrólisis enzimática

Inicialmente, la anchoveta entera se descongeló 10 horas previas a su utilización; la materia prima se cortó en medallones de 0.5 cm, no es necesario formar una pasta porque esto dificulta en la extracción de aceite; se mezcló con agua destilada en un vaso precipitado de 2 L a un factor de dilución entre 0.7 a 1.3 kg pescado por cada kg de agua. Luego, se calentó a 85°C durante 10 minutos, este procedimiento previo a la hidrólisis enzimática se realiza en estudios de optimización (Molla y Hoyannisyan, 2011; Guerard *et al.*, 2002; Ovissipour *et al.*, 2009^{a,b}) con la finalidad de inactivar las enzimas endógenas, reducir la carga de microorganismos patógenos capaces de formar aminos biogénicas y desnaturalizar las proteínas en estado nativo; finalizado el tiempo, se enfrió la mezcla y se agregó al biorreactor (Biostat Aplus 2L). La hidrólisis por acción de la enzima comercial se llevó a cabo a una agitación de 100 rpm por medio de turbinas Rushton, se trabajó a esa velocidad para evitar formar un flujo turbulento que genere la emulsificación de las grasas con las proteínas; se mantuvo a una temperatura de 55±1°C y el pH 7.5±0.1 se ajustó con una

solución de NaOH 0.1 N, estas condiciones ambientales están en función a los parámetros óptimos de la enzima comercial Protamex™ que nos proporciona el proveedor y por reportes de otras investigaciones (Fernández *et al.*, 2016; Xi-Qun *et al.*, 2015; Batista *et al.*, 2010; Olajuvigbe y Ajele, 2008; Liaset *et al.*, 2003; Liaset *et al.*, 2002). Después de estabilizar las condiciones ambientales durante 5 minutos, se añadió la enzima (10 – 35 UA/kg proteína cruda) y se monitorizó la reacción por el método pH-Stat usando el sistema de titulación automática del biorreactor. Las pruebas experimentales se realizaron de acuerdo con el diseño de Box-Behnken el cual se muestra en la Cuadro 5. Finalizado el tiempo de reacción (60 a 180 min) se hizo un pre-filtrado del líquido hidrolizado en mallas de 0.5 mm para la separación de espinas, inmediatamente se inactivó la enzima comercial por calentamiento de la mezcla (85°C durante 10 minutos). Para la separación de las proteínas solubles de las proteínas insolubles y la fracción oleosa, se utilizó la centrífuga Sigma modelo P-selecta 209 a 5000 rpm y 40°C, durante 20 minutos. Las proteínas solubles presentes en el hidrolizado fueron almacenadas en envases PET a -18°C durante 6 meses, para sus respectivos análisis. La figura 7 muestra el montaje experimental utilizado para la hidrólisis enzimática de la anchoveta entera en el reactor de 2 L.



Figura 7: Montaje experimental para la hidrólisis enzimática de proteínas en anchoveta entera, biorreactor 2L.

El diseño Box- Behnken, presentado en la Cuadro 5, fue utilizado para estudiar los efectos de las variables: factor de dilución, relación enzima sustrato y tiempo de reacción, sobre el grado de hidrólisis, la recuperación de proteína y distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos.

Cuadro 5: Ensayos del diseño experimental, variando la relación enzima sustrato**(E/S), el factor de dilución (D) y el tiempo de reacción (t)**

Ensayo	Variables independientes					
	Real			Codificado		
	E/S	D	t	E/S	D	T
1	10	0.7	120	-1.0	-1.0	0.0
2	60	0.7	120	1.0	-1.0	0.0
3	10	1.3	120	-1.0	1.0	0.0
4	60	1.3	120	1.0	1.0	0.0
5	10	1.0	60	-1.0	0.0	-1.0
6	60	1.0	60	1.0	0.0	-1.0
7	10	1.0	180	-1.0	0.0	1.0
8	60	1.0	180	1.0	0.0	1.0
9	35	0.7	60	0.0	-1.0	-1.0
10	35	1.3	60	0.0	1.0	-1.0
11	35	0.7	180	0.0	-1.0	1.0
12	35	1.3	180	0.0	1.0	1.0
13	35	1.0	120	0.0	0.0	0.0
14	35	1.0	120	0.0	0.0	0.0
15	35	1.0	120	0.0	0.0	0.0

Donde: E:S, es la relación enzima sustrato (UA/kg proteína cruda); D, es el factor de dilución (kg pescado/kg de agua); t, es el tiempo de reacción (minutos).

3.3.4.1. Determinación del grado de hidrólisis

La determinación del grado de hidrólisis fue realizada a través del método pH – Stat, que es un método de titulación de los grupos α -amino, liberados en condiciones ambientales constantes (pH y temperatura). El grado de hidrólisis fue definido por Adler-Nissen (1986) como el número de enlaces peptídicos hidrolizados, expresados en equivalentes de hidrólisis (h), con respecto al número total de enlaces peptídicos antes de la reacción (h_{total}).

El consumo de base es proporcional al número de enlaces peptídicos escindidos, por lo que se aplica la ecuación 2 descrita por Adler-Nissen (1986), para determinar el grado de hidrólisis.

3.3.4.2. Recuperación de proteína

La recuperación de proteína fue utilizada como un índice del contenido de proteína soluble, definida como la relación entre la masa de proteína en el hidrolizado y la masa de la proteína cruda presente al inicio de la reacción (Diniz y Martin, 1998), calculado por la siguiente ecuación:

$$RP (\%) = \frac{MP_S}{MP} \times 100$$

Ecuación 5: Recuperación de proteína.

Dónde: RP es la recuperación de proteína (%); MP_S es el contenido de proteína soluble presente en el hidrolizado (g); MP es el contenido de

proteína cruda presente en la anchoveta (g). Para la determinación de proteína se utilizó el método AOAC 940.25 – 2005.

3.3.4.3. Distribución aparente del peso molecular

La distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos se determinó mediante el perfil electroforético, el cual fue realizado en minigeles de poliacrilamida de 8 x 7 x 0.05 cm a la concentración de 15% del gel separador y 3% del gel concentrador, de acuerdo con Schagger y Jagow (1987), para péptidos con masa molecular menor de 30 KDa. El análisis fue realizado a 220 V por 45 minutos, usando el equipo Mini Protean Tetra Cell, Biorad y la fuente de poder Power Pac 300 Biorad (Figura 8).



Figura 8: Corrida electroforética de los hidrolizados de anchoveta.

Las muestras fueron preparadas según la técnica de SDS-PAGE, con algunas modificaciones al método descrito por Schagger y Jagow

(1987), la cual consistió en tratar las muestras con 0.01 M de Tris-HCl pH 8.0; 1% de dodecil sulfato de sodio; 6% de glicerol y 1% de azul de bromofenol, para luego ser calentado a 65°C por 20 min con lo que se logró una unión más estable entre el SDS y la proteína (Figura 9). Finalmente la concentración de cada muestra fue a 14.40 ug/uL.



Figura 9: Calentamiento de las muestras a 65°C durante 20 minutos.

La masa molecular media de las bandas se estimó mediante el uso de un marcador de proteína perfecta, el cual consiste en una mezcla de 9 proteínas recombinantes de tamaño preciso de 10, 15, 25, 35, 75, 100, 150 y 225 KDa, número de catálogo 69079-3 Novagen (Merck, Alemania).

3.3.5. Mecanismo de reacción

La hidrolisis enzimática de las proteínas siempre ha dado lugar a una curva de hidrolisis con una forma típica: una fase de hidrolisis inicial rápida, seguida de una disminución de la velocidad de reacción. Se comprobó si esta forma típica

se debe al agotamiento del sustrato, a la inhibición por productos o la inactivación térmica de la enzima, siguiendo la metodología descrita por Valencia *et al.*, (2014).

3.3.5.1. Efecto del agotamiento de sustrato en la velocidad inicial

Se estudió el efecto del agotamiento de sustrato en la velocidad inicial de hidrólisis para determinar el tipo de inhibición en la reacción enzimática. Las concentraciones de sustrato utilizados van desde 1.24 a 11.12 g/L de proteína cruda.

- Para preparar la concentración de sustrato 1.24 g/L, se mezcló 6.71 g de anchoveta entera (13.86% de proteína), lo cual contiene 0.93 g de proteína cruda y se le agregó 743.29 g de agua destilada.

- Para preparar la concentración de sustrato 11.12 g/L, se mezcló 60.17 g de anchoveta entera, lo cual contiene 8.34 g de proteína cruda y se le agregó 689.83 g de agua destilada.

La hidrólisis enzimática de proteínas se siguió hasta un tiempo de reacción de 60 minutos, las condiciones de reacción se fijaron en 55°C y un pH de 7.5.

3.3.5.2. Efecto de los productos en la velocidad inicial

Se estudió el efecto de los productos en la velocidad inicial de hidrólisis para determinar el tipo de inhibición en la reacción enzimática.

Los productos se prepararon por hidrólisis de 50 g/L de proteína cruda, como se ha descrito previamente hasta obtener un grado de hidrólisis del 5%.

Las velocidades iniciales de hidrólisis se determinaron como se ha descrito anteriormente, en presencia de productos de hidrólisis al 4.5% y 9.0% (p/p) de hidrolizado con respecto a la masa total de proteína homogenizada.

- Para preparar la concentración de sustrato 1.24 g/L: Se requirieron adicionar 743.29 g de solvente con una concentración de 4.5% y de 9.0% de hidrolizado proteico al 5% GH, para esto, se agregó 33.45 g y 66.90 g de hidrolizado, respectivamente, el resto se completó con agua destilada.

- Para preparar la concentración de sustrato 11.12 g/L: Se requirieron adicionar 689.83 g de solvente con una concentración de 4.5% y de 9.0% de hidrolizado proteico al 5% GH, para esto, se agregó 31.04

g y 62.08 g de hidrolizado, respectivamente, el resto se completó con agua destilada.

La hidrólisis enzimática de proteínas se siguió hasta un tiempo de reacción de 60 minutos, las condiciones de reacción se fijaron en 55°C y un pH de 7.5.

3.3.5.3. Efecto de la inactivación térmica de la enzima

Los experimentos para evaluar la inactivación térmica de la enzima se realizaron a 55°C en condiciones no reactivas y reactivas. Los experimentos con la condición no reactiva se realizaron en 750 ml de tampón de fosfato de potasio a 50 mM a un pH de 7.50 con 24 mUA/ml de Protamex. La misma mezcla se utilizó para las condiciones reactivas con la adición de sustrato de 1.24 y 11.12 g/L de proteína cruda, así como, los productos del hidrolizado con 5% del grado de hidrólisis. La inactivación térmica se inició mediante la adición de 2 mL de enzima a las mezclas después de que se equilibraron a 55°C. Las muestras fueron retiradas para someter al ensayo de actividad enzimática utilizando caseína como sustrato. La actividad relativa se calculó y se normalizó con respecto a la actividad inicial. La actividad relativa (A/A_0) se representó gráficamente frente al tiempo de inactivación, y la constante de la inactivación térmica se calculó basándose en una inactivación de primer orden como se describe en la ecuación 6.

$$\frac{A}{A_0} = e^{-k_d \cdot t}$$

Ecuación 6: Actividad enzimática relativa.

En la ecuación anterior, k_d es la constante de inactivación de primer orden y t es el tiempo de inactivación.

3.3.5.4. Determinación de la velocidad inicial de hidrólisis

La velocidad de hidrólisis se determinó en base a la velocidad inicial usando el método del pH-Stat para cuantificar los grupos α -NH liberados de la hidrólisis de los enlaces peptídicos. El biorreactor de laboratorio BIOSTAT - Aplus se utilizó para este propósito. La mezcla de reacción se dejó equilibrar a 55°C por medio de una chaqueta térmica y el pH se ajustó mediante la adición de solución de NaOH. La enzima se diluyó en 10 mM de tampón de acetato de sodio y 5 mM de tampón acetato de calcio. Un total de 1 mL de la solución de enzima con 24 mUA (unidades Anson) se añadió a 750 g de mezcla de reacción para iniciar la reacción de hidrólisis. El pH se controló y se añadió 0.1 N de NaOH para mantener un pH constante. Los grupos α -NH liberados se calculan de acuerdo a la ecuación 7:

$$\alpha\text{-NH (mM)} = \frac{V \times N}{\alpha}$$

Ecuación 7: Determinación de la liberación de los grupos aminos.

En la ecuación anterior, V es el volumen de NaOH añadido, N es la concentración de NaOH y α es el grado medio de la disociación de los grupos α -NH calculados en función del pH y la temperatura, como se detallada en la ecuación 2 y 3.

3.3.5.5. Cálculo de los parámetros cinéticos

La gráfica de la velocidad inicial (V_0) frente la concentración de sustrato (S_0) se utilizó para calcular los parámetros cinéticos del modelo cinético de la enzima, según la ecuación 8.

$$V_0 = \frac{V_{\max} \times S_0}{K_m + S_0 + \left(\frac{S_0^2}{K_S} \right)}$$

Ecuación 8: Velocidad inicial de reacción.

Dónde: V_0 es la velocidad inicial de la reacción (mM/min); V_{\max} es la velocidad máxima de reacción (mM/min); K_m es la constante de Michaelis – Menten (mM); K_s constante de inhibición por sustrato (mM) y S_0 es la cantidad de sustrato inicial (mM).

Los valores de V_{\max} , K_m y K_S se obtuvieron por una estimación no lineal de la gráfica de V_0 en función de S_0 utilizando la metodología Cuasi-Newton.

Para determinar el tipo de inhibición por productos de hidrólisis, se aplicó Lineweaver-Burk para evaluar gráficamente los $1/V_0$ en función de $1/S_0$ a diferentes concentraciones de productos de hidrólisis.

Después de determinar el tipo de inhibición, el modelo cinético de inhibición adecuada fue elegido para calcular las constantes de inhibición (K_i y K'_i) de acuerdo con la ecuación 9 de Lineweaver-Burk:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m \times i}{V_{\max}} \times \frac{1}{S_0} + \frac{i'}{V_{\max}}$$

Ecuación 9: Lineweaver-Burk.

$$i = 1 + \frac{I}{K_i}$$

Ecuación 10: Factor de inhibición competitivo.

$$i' = 1 + \frac{I}{K'_i}$$

Ecuación 11: Factor de inhibición no competitivo.

La pendiente (m) y la intersección (b) de las gráficas Lineweaver-Burk se utilizaron para construir gráficas secundarias de (m) y (b) frente a la concentración del producto de hidrólisis (I) usando las siguientes ecuaciones 12 y 13:

$$m = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{I}{K_i}$$

Ecuación 12: Pendiente de la gráfica de Lineweaver-Burk.

$$b = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} \times \frac{I}{K_i}$$

Ecuación 13: Intersecto de la gráfica de Lineweaver-Burk.

Las constantes de inhibición K_i y K_i' se calcularon utilizando estas gráficas secundarias.

3.3.5.6. Simulación de las curvas de hidrólisis

Una curva de hidrólisis experimental fue creada para comparar los efectos de agotamiento de sustrato, la inhibición del producto y la inactivación térmica de la enzima en la forma de la curva de conversión. Las condiciones experimentales fueron pH de 7.5, 55°C, la concentración de proteína inicial 4.5% (p/p) y una actividad de Protamex de 24 mUA/mL. La curva de la hidrólisis se obtuvo de la titulación de los grupos α -NH utilizando la técnica de pH-Stat con un tiempo de reacción de 120 min. Las simulaciones se crean usando las constantes cinéticas determinadas a partir de los experimentos sobre la velocidad de reacción inicial y la inactivación térmica. El modelo cinético descrito en la ecuación (8) se utilizó para las simulaciones sin inhibición y con inactivación térmica. Cuando se considera la inhibición por agotamiento de sustrato se utilizó la ecuación (9),

empleando la ecuación mostrada en la fila 4 de la Cuadro 6. Cuando se considera la inhibición por producto, los factores i y i' a partir de las ecuaciones (10) y (11) se añadieron a la ecuación (8), empleando la ecuación mostrada en la fila 6 de la Cuadro 6. Cuando se consideró la inactivación de la enzima, el decaimiento exponencial de la ecuación (6) se añadió a la ecuación (8), empleando la ecuación mostrada en la fila 6 de la Cuadro 6. Las gráficas generadas consistieron en grado de conversión (X) frente al tiempo de reacción. El 'X' se define como la relación entre los enlaces peptídicos escindidos y los enlaces de péptidos totales enzimáticamente escindibles.

Cuadro 6: Modelos de rendimiento para un reactor enzimático de tanque agitado por lotes para reacciones de un solo sustrato

Modelos Cinéticos	$\frac{k \cdot e}{K_M} \tau = \frac{k \cdot E}{K_M \cdot F} =$
M-M	$\frac{S_i}{K_M} \cdot X - \text{Ln} (1-X)$
IC por P	$S_i \cdot X \cdot \left[\frac{1}{K_M} - \frac{1}{K_{IC}} \right] - \left[1 + \frac{S_i}{K_{IC}} \right] \text{Ln} (1-X)$
Total NCI por P	$S_i \cdot X \cdot \left[\frac{1}{K_M} - \frac{1}{K_{IC}} \right] - \left[1 + \frac{S_i}{K_{INC}} \right] \text{Ln} (1-X) + \frac{S_i^2 X^2}{2K_M K_{INC}}$
Total UCI por S	$\frac{S_i X}{K_M} - \text{Ln} (1-X) + \frac{S_i^2 X}{K_M K_S} (1-0.5 \cdot X)$
IC por P1 y NCI por P2	$S_i \cdot X \cdot \left[\frac{1}{K_M} - \frac{1}{K_{IC}} - \frac{1}{K_{INC}} \right] - \left[1 + \frac{S_i}{K_{IC}} + \frac{S_i}{K_{INC}} \right] \text{Ln} (1-X) + \frac{S_i^2 X^2}{2K_M K_{INC}}$

M-M: Cinéticas Michaelis-Menten; IC: Inhibición competitiva; NCI: Inhibición no-competitiva; UCI: Inhibición acompetitiva; S: sustrato; P1, P2: productos de la reacción

Fuente: Illanes *et al.*, 2014

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

En la figura 10 se muestra una curva típica de formación de producto (tirosina) en función del tiempo para una reacción catalizada a tres concentraciones diferentes de enzima Protamex™. Se observa que la velocidad disminuye con el tiempo, hecho que puede deberse a las siguientes causas: algunos de los productos pueden inhibir la enzima; el transcurso de la reacción produce una disminución significativa de la concentración de sustrato (S); la reacción inversa puede comenzar a cursar y hacerse relativamente importante al aumentar la concentración de producto (P).

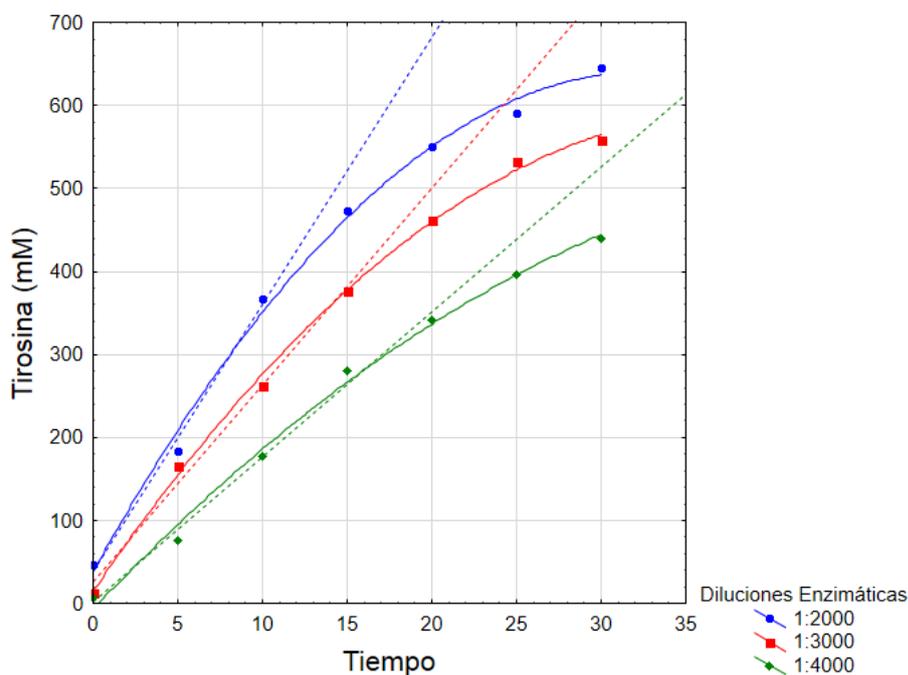


Figura 10: Formación de tirosina en función del tiempo a diferentes diluciones enzimáticas.

Se determinó que el rango de linealidad para las diluciones enzimáticas de 1:2000, 1:3000 y 1:4000 son de 10, 15 y 20 minutos, respectivamente. De esta manera las

diferentes causas que producen la disminución de la actividad con el tiempo son eliminadas.

La enzima comercial Protamex™ presenta una actividad de 369.435 ± 19.109 U/mg, siendo U la cantidad en micromoles equivalentes de tirosina liberados de la caseína por cada minuto a pH 7.5 y 37 °C. En otras investigaciones se han reportado una actividad de la Protamex™ de 2100 U/mg (Zhang *et al.*, 2016), 31.4 U/mg (Song *et al.*, 2016) y 125 U/mg (Kolpakova *et al.*, 2014). Se puede notar que la actividad enzimática obtenida en esta investigación presenta diferencia a los valores reportados por los autores mencionados, debido a que en dichas investigaciones no se precisa el sustrato utilizado, ni las condiciones ambientales (pH y temperatura) con la que se llevan a cabo la metodología experimental.

4.2.DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

La figura 11 representa el diagrama de Lineweaver-Burk como herramienta gráfica para calcular los parámetros cinéticos de la enzima Protamex. Los parámetros cinéticos obtenidos son: la constante de Michaelis-Menten (K_m) de 11.217 g/L y la velocidad máxima (V_{max}) de 0.0116 g/L×min, variando las concentraciones de caseína en la mezcla de reacción entre 8.00 – 17.50 g/L, trabajando a la temperatura de 37 °C y al pH 7.5.

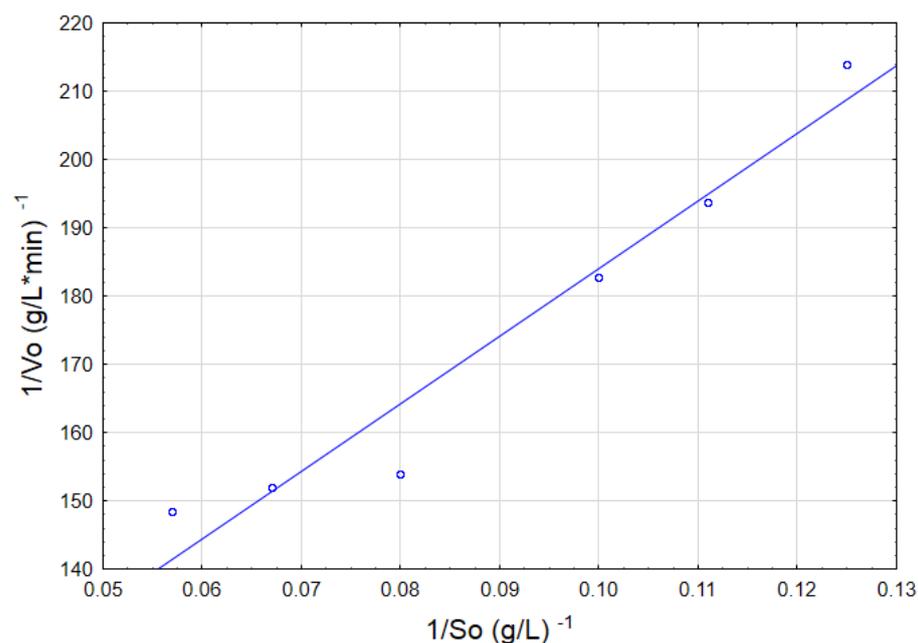


Figura 11: Representación de Lineweaver y Burk para la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima Protamex™.

No se encontraron reportes en la literatura usando la enzima Protamex™ y la anchoveta entera para poder comparar los valores obtenidos de grado de hidrólisis.

4.3.COMPOSICIÓN QUÍMICA PROXIMAL DE LA ANCHOVETA ENTERA

La composición química de la anchoveta entera se detalla en la Cuadro 7.

Cuadro 7: Composición por 100 g de anchoveta entera

Análisis (base húmeda %)	Media ± desviación estándar
Humedad	77.65 ± 0.15
Proteína	13.86 ± 0.14
Grasa	5.24 ± 0.15
Ceniza	2.71 ± 0.01

Puede notarse en la Cuadro 7 que la composición proximal obtenida en este trabajo presenta una variación con respecto a los valores obtenidos por otros autores. Esto se debe a que la composición proximal del pescado es influenciada por la edad, sexo, época de año y madurez de las gónadas. En un estudio realizado por Ordoñez y Hernández (2014), los autores determinaron la composición proximal de la anchoveta entera (*Engraulis ringens*) y obtuvieron los siguientes resultados: $73.5\% \pm 0.01$ de humedad, $18.4\% \pm 0.1$ de proteína, $6.99\% \pm 0.04$ de grasa y $1.33\% \pm 0.04$ de ceniza. En otro estudio, Reyes-García *et al.*, (2009) reportó 70.8% de humedad, 19.1% de proteína, 8.2% de grasa y 1.2% de ceniza.

4.4.HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Al iniciar el proceso enzimático las proteínas de la anchoveta entera experimentan una hidrolisis rápida, cambiando la apariencia de la mezcla desde muy viscosa, debido al alto contenido de partículas en suspensión, hasta un fluido, por la solubilización de las partículas suspendidas. En la figura 12 se muestra la apariencia al inicio y al final del proceso de hidrolisis.

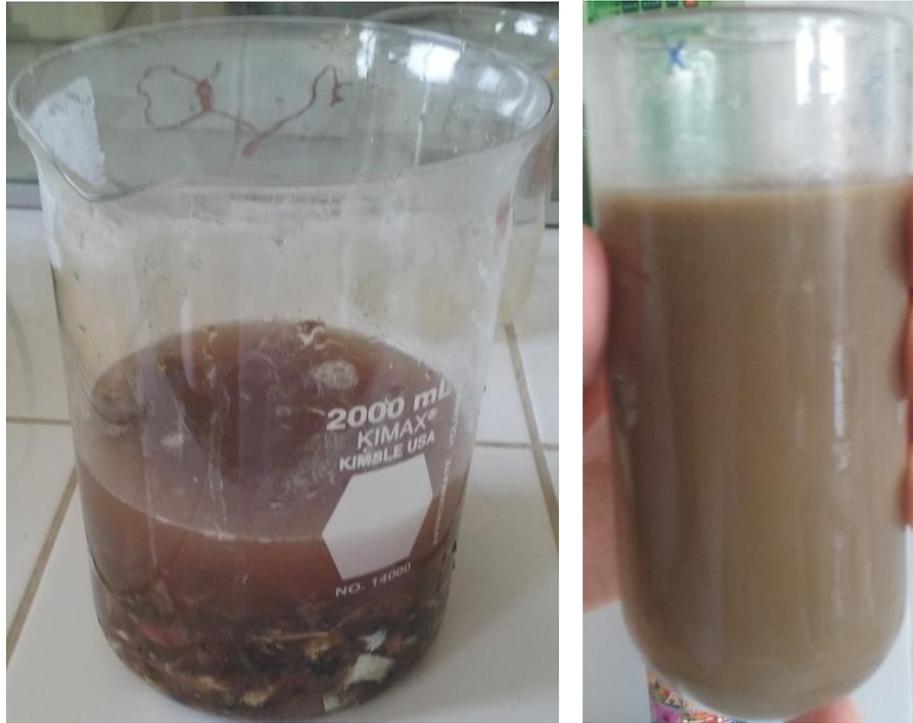


Figura 12: A la izquierda, mezcla inicial de pescado con agua, a la derecha el hidrolizado proteico.

Las figuras 13, 14, 15 y 16 muestran el monitoreo del grado de hidrólisis a través del tiempo. Se observa que se obtienen altas velocidades de reacción al comienzo de la hidrolisis proteica, sin embargo, la velocidad de hidrólisis va disminuyendo hasta ser casi constante después de 150 min. Este perfil de la curva de hidrólisis enzimática, puede estar asociada con varios factores, tales como el agotamiento de la concentración de enlaces peptídicos disponibles para la escisión; la competencia entre el sustrato original y los péptidos que se van formando durante la reacción y la disminución de la actividad enzimática debido a una inactivación térmica de la enzima (Guerard *et al.*, 2002; Adler-Nissen, 1986; Gonzalez-Tello *et al.*, 1994).

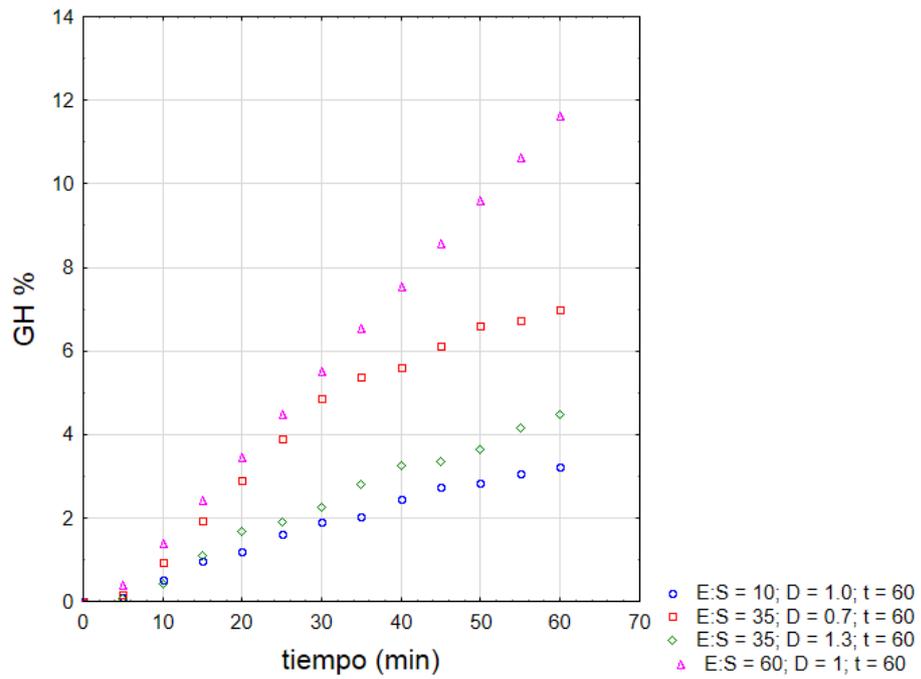


Figura 13: Cinética de hidrólisis enzimática en anchoveta entera a 60 minutos de reacción.

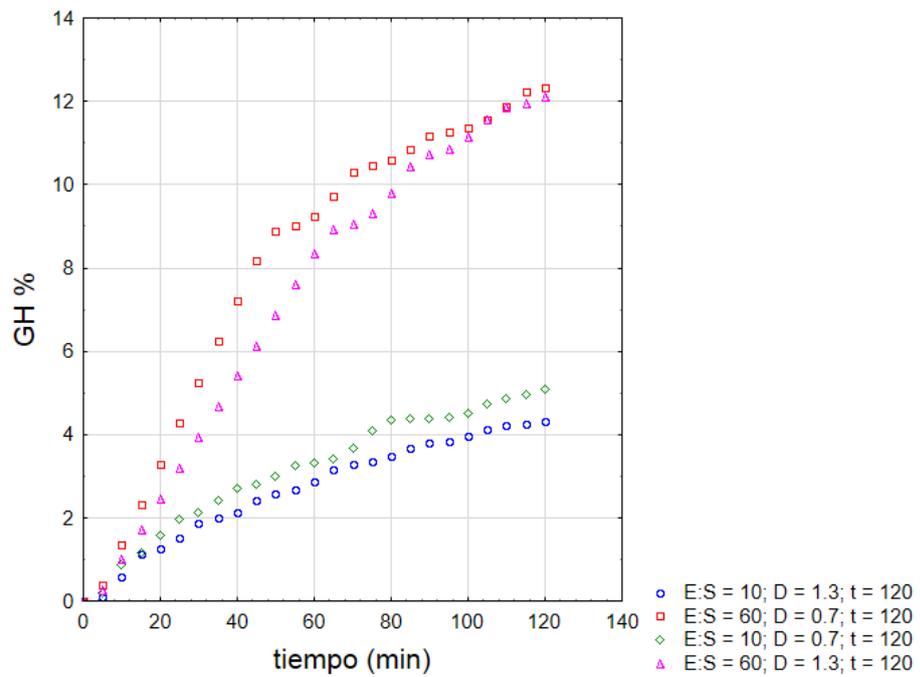


Figura 14: Cinética de hidrólisis enzimática en anchoveta entera a 120 minutos de reacción.

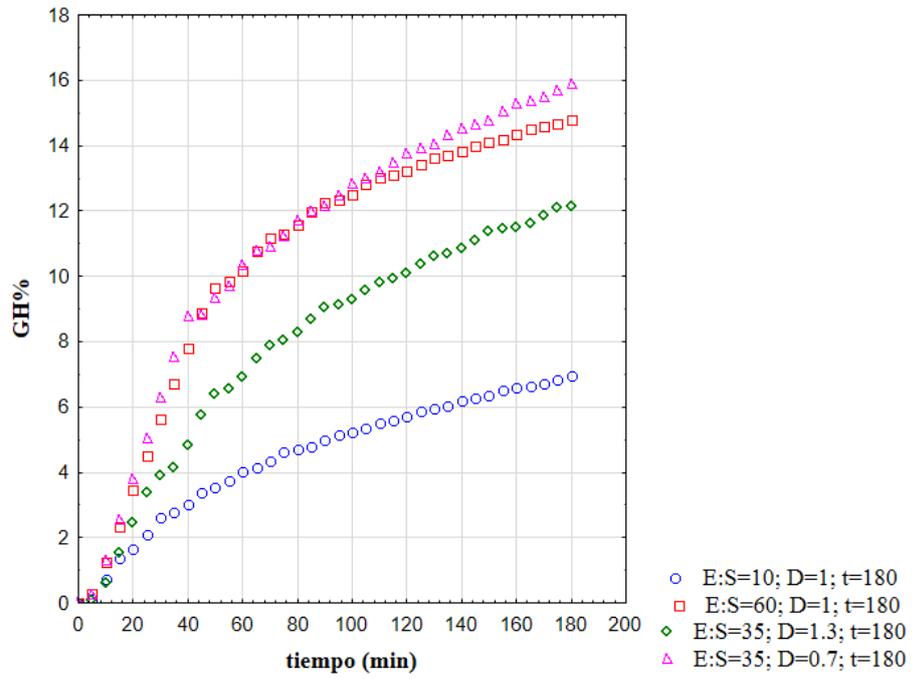


Figura 15: Cinética de hidrolisis enzimática en anchoveta entera 180 minutos de reacción.

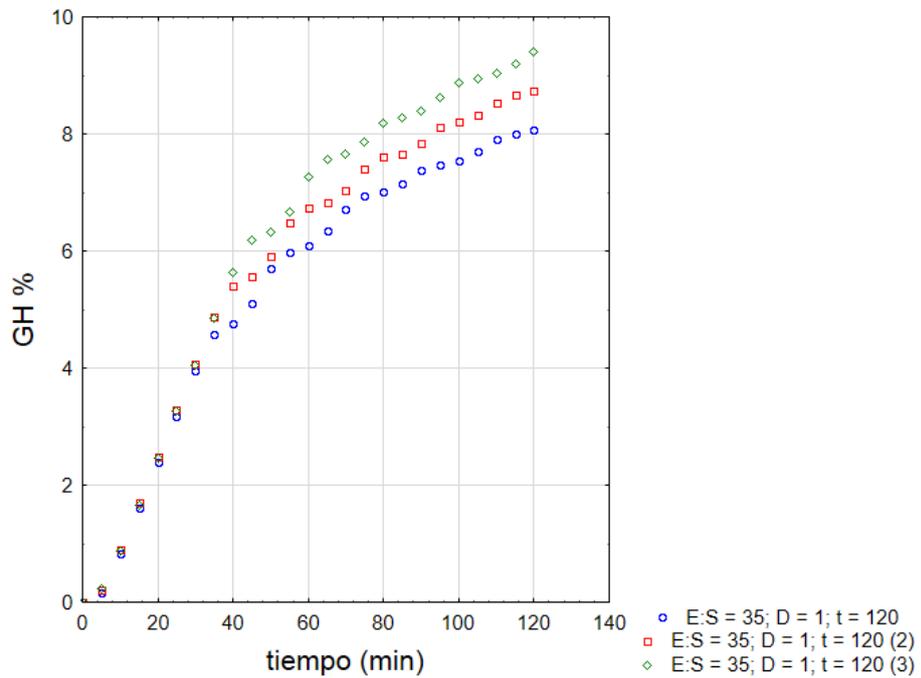


Figura 16: Cinética de hidrolisis enzimática en anchoveta entera puntos centrales.

En los ensayos de 60 min (Figura 13), el ensayo 6 (60 UA/ kg proteína cruda, 1.0 kg pescado/ kg de agua) tuvo el mayor valor del grado de hidrólisis (11.63%).

En los ensayos de 120 min (Figura 14), el ensayo 2 (60 UA/kg proteína cruda, 1.3 kg pescado/ kg de agua) tuvo el mayor valor del grado de hidrólisis (12.10%).

En los ensayos de 180 min (Figura 15), el ensayo 11 (35 UA/kg proteína cruda, 0.7 kg pescado/ kg de agua) tuvo el mayor valor del grado de hidrólisis (11.99%).

En los ensayos correspondientes a los puntos centrales, (Figura 16), 35 UA/kg proteína cruda, 1.0 kg pescado/ kg de agua, se obtuvieron valores del grado de hidrólisis muy cercanos unos de otro.

Los resultados obtenidos de la forma de la curva de hidrólisis, concuerdan con otras investigaciones en hidrolizados por acción enzimática a diferentes sustratos, *Thunnus albacares* (De Oliveira *et al.*, 2016), *Sardine pilchardus* (García-Moreno *et al.*, 2016), *Capros aper* (Shikha *et al.*, 2016), *Arctoscopus japonicus* (Jang *et al.*, 2016), *Oreochromis niloticus* (Jumardi *et al.*, 2014), *Channa striatus* (Ghassem *et al.*, 2011), *Nemipterus japonicus* (Naqash y Nazeer, 2011), incluyendo cangrejos (Beak y Cadwallader, 1995), proteína concentrada de salvado de avena (Guan *et al.*, 2006), proteína de soya (Jung *et al.*, 2005), suero de proteína de leche (Chobert *et al.*, 1988), huesos de ternero (Linder *et al.*, 1996) y girasol (Martínez *et al.*, 2005).

Adler-Nissen, (1986) explica que la forma que tiene la curva de hidrólisis es el resultado de la competencia entre el sustrato original y los péptidos que se están formando constantemente durante la hidrólisis. Archer *et al.*, (1973) sugirieron que la enzima hidroliza rápidamente a las partículas proteicas que se encuentran insolubles en el medio de reacción, y luego, degradan a las cadenas de polipéptidos solubles en el medio, en esta etapa, la masa proteica interna se hidroliza más lentamente porque la disponibilidad del sustrato disminuye a medida que aumenta el tiempo de reacción.

4.5.EVALUACIÓN DEL GRADO DE HIDROLISIS, RECUPERACIÓN DE PROTEÍNAS Y DISTRIBUCIÓN APARENTE DEL PESO MOLECULAR DE LOS PÉPTIDOS OBTENIDOS

En la Cuadro 8, se muestra en detalle los valores del grado de hidrólisis, recuperación de proteínas y distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos en las 15 experiencias del diseño experimental utilizado en esta investigación.

Para las condiciones utilizadas en el proceso, presentadas en la Cuadro 8, los valores del grado de hidrólisis variaron de 4.43 a 16.98%, para la recuperación de proteína variaron de 51.55 a 75.32% y para la distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos variaron de 9.00 a 14.43 KDa. Los puntos centrales para las respuestas presentaron una variación menor a 7.72% para grado de hidrolisis, 1.57 % para recuperación de proteínas y 2.20 % para la distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos; indicando buena reproducibilidad del proceso.

Cuadro 8: Resultados experimentales del grado de hidrolisis y de la recuperación de proteína en los 15 ensayos del diseño experimental

Ensayo	Variables independientes						Variables respuestas		
	Real			Codificado			GH (%)	RP (%)	MW (KDa)
	E/S	D	t	E/S	D	T			
1	10	0.7	120	-1.0	-1.0	0.0	7.01	65.90	14.43
2	60	0.7	120	1.0	-1.0	0.0	16.98	75.32	12.04
3	10	1.3	120	-1.0	1.0	0.0	5.96	52.44	12.78
4	60	1.3	120	1.0	1.0	0.0	16.68	62.39	10.30
5	10	1.0	60	-1.0	0.0	-1.0	4.43	54.68	12.05
6	60	1.0	60	1.0	0.0	-1.0	16.03	62.53	9.00
7	10	1.0	180	-1.0	0.0	1.0	6.94	61.03	13.03
8	60	1.0	180	1.0	0.0	1.0	14.81	71.71	11.06
9	35	0.7	60	0.0	-1.0	-1.0	9.64	62.26	12.91
10	35	1.3	60	0.0	1.0	-1.0	6.17	51.55	12.69
11	35	0.7	180	0.0	-1.0	1.0	16.52	72.80	12.00
12	35	1.3	180	0.0	1.0	1.0	12.16	60.62	12.03
13	35	1.0	120	0.0	0.0	0.0	11.11	63.53	12.28
14	35	1.0	120	0.0	0.0	0.0	12.04	62.53	12.74
15	35	1.0	120	0.0	0.0	0.0	12.97	64.53	12.78

4.5.1. Grado de hidrolisis

Los valores del grado de hidrolisis utilizando la metodología del pH-Stat varió desde 4.43% hasta 16.98% bajo variaciones sistemáticas de los niveles altos y bajos de relación enzima sustrato (E:S), factor de dilución (D) y tiempo de reacción (t).

Los efectos de los factores lineales y de las interacciones cuadráticas sobre el grado de hidrólisis se presentan en la Cuadro 9, donde los valores en negrita son significativos al 95% de confianza ($p \leq 0,05$).

Cuadro 9: Efecto estimado, error estándar, coeficiente t y significancia estadística para cada factor en el modelo codificado para la respuesta grado de hidrólisis

	Efecto	Error estándar	t (9)	Valor P
Media	11.29667	0.275515	41.00203	< 0.0001
E:S (L)	10.04000	0.754528	13.30633	< 0.0001
D (L)	-1.75500	0.795343	-2.20660	0.054
t (L)	2.57500	0.795343	3.23760	0.010
E:S ² × D	-1.62000	0.754528	-2.14704	0.060
E:S² × t	2.89500	0.754528	3.83683	0.003

A través de la Cuadro 9, para la respuesta grado de hidrólisis, se observa que los factores E:S (L), t (L) y la interacción entre las variables E:S²×t presentaron efecto positivo en el grado de hidrólisis, es decir, el aumento de estas variables eleva el valor del grado de hidrólisis. Se observó que el factor D (L) y la interacción entre las variables E:S²×D se consideraron no estadísticamente

significativas en la respuesta grado de hidrólisis, al nivel de significancia del 5%.

Se verificó la significancia de la regresión al nivel de confianza del 95%, a través del análisis de varianza (ANOVA), utilizando el valor-p. En la Cuadro 10 se encuentran los valores calculados de p.

Cuadro 10: Análisis de varianza del modelo ajustado para la respuesta grado de hidrólisis

	Suma de cuadrado	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
E:S (L)	201.603	1	201.603	177.058	< 0.0001
D (L)	5.544	1	5.544	4.869	0.055
t (L)	11.935	1	11.935	10.482	0.010
E:S ² × D	5.249	1	5.249	4.610	0.060
E:S² × t	16.762	1	16.762	14.721	0.004
Error	10.248	9	1.139		
Total	269.459	14			
R ²	0.962				

Los valores p pueden indicar cómo son los datos de incompatibles con cierto modelo estadístico. El valor-p para cada término comprueba la hipótesis nula de que el coeficiente es igual a cero (no tiene efecto). Para las variables E:S (L), t (L) y el efecto E:S² × t, presentaron un valor-p bajo (< 0.05) indicando que se rechaza la hipótesis nula. En otras palabras, es probable que tengan una adición significativa al modelo planteado porque los cambios en sus niveles altos y bajos de los valores en negrita presentados en la Cuadro 10 están relacionados con cambios en la variable de respuesta (grado de hidrólisis).

El coeficiente de determinación para el modelo ajustado fue de 0.962 para el grado de hidrólisis, indicando que el modelo obtenido explica el 96.197% de la variación de los datos observados para el grado de hidrólisis. La introducción de interacciones lineales y cuadráticas aumentó la varianza explicada en el modelo utilizado. Además, la comparación de la suma de los residuos absolutos entre el grado de hidrólisis medido y previsto, finalmente confirmo este modelo.

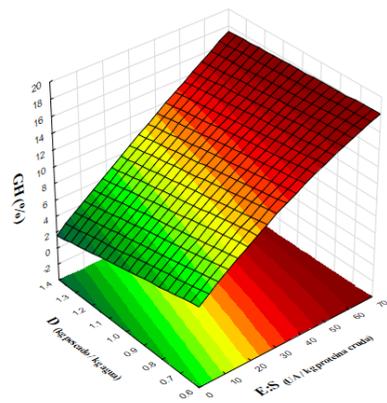
Por lo tanto, el modelo codificado ajustado para la respuesta grado de hidrólisis, en la hidrólisis enzimática de la anchoveta entera, es:

$$\text{GH (\%)} = (2549.5 \times \text{E:S} - 0.7 \times \text{E:S}^2 - 51375.9 \times \text{D} + 1173.5 \times \text{t} - 2.8 \times \text{t}^2 + 8.5 \times \text{E:S}^2 \times \text{D} - 0.1 \times \text{E:S}^2 \times \text{t} - 7483.7) \times 10^{-4}$$

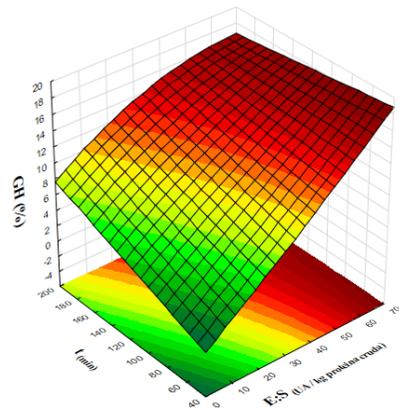
Dónde: GH es el grado de hidrólisis, (%); E:S es la relación enzima sustrato, (UA / kg proteína cruda); D es el factor de dilución, (kg pescado / kg agua); t es el tiempo de reacción (minutos).

En la Figura 17, se muestra las superficies de respuesta generadas a través del modelo propuesto para el grado de hidrólisis “GH”. La figura 17A, expresa la interacción entre las variables ‘E:S’ y ‘D’ sobre la respuesta, permaneciendo constante la variable ‘t’ en el punto central. La figura 17B, expresa la interacción entre las variables ‘E:S’ y ‘t’ sobre la respuesta, permaneciendo constante la variable ‘D’ en el punto central. La figura 17C, expresa la

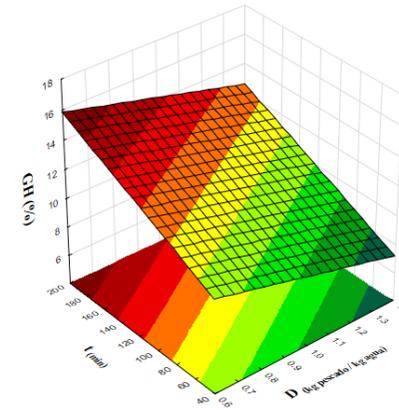
interacción entre las variables 'D' y 't' sobre la respuesta, permaneciendo constante la variable 'E:S' en el punto central.



A



B



C

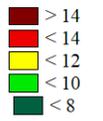


Figura 17: Superficies de respuesta graficadas a partir del modelo de grado de hidrolisis.

La Figura 17 (A) muestra que al incrementar la relación enzima sustrato y disminuir el factor de dilución, conduce al aumento del grado de hidrolisis, siendo la relación enzima sustrato la que influye más. La Figura 17 (B) muestra que al incrementar la relación enzima sustrato y el tiempo de reacción, conduce a un aumento significativo del grado de hidrolisis. La Figura 17 (C) muestra que al incrementar el tiempo y disminuir el factor de dilución, conduce al aumento del grado de hidrólisis, siendo el tiempo el de mayor influencia significativa.

La utilización del método pH-Stat para el monitoreo de la hidrolisis de proteínas por acción enzimática en condiciones de pH constantes, permite obtener datos precisos en tiempo real y proporciona una mejor cinética de reacción. Hecho que coincide con Fernández *et al.*, (2016), quienes emplearon NaOH al 1 N para mantener el pH constante de 7.0 durante la hidrólisis de un aislado comercial de suero leche por acción de la enzima comercial Protamex™; Xi-Qun *et al.*, (2015), quienes emplearon NaOH al 0.1 N para mantener el pH constante de 7.0 durante la hidrólisis del gluten de maíz por acción de la enzima comercial Protamex™; Douglas *et al.*, (2007), quienes emplearon NaOH al 2 N para mantener el pH constante de 8.0 durante la hidrólisis del pescado caribe colorado por acción de la enzima comercial Alcalase® 2.4 L; Souissi *et al.*, (2006), quienes emplearon NaOH al 4 N para mantener el pH constante de 8.0 durante la hidrólisis de sardina por acción de la enzima comercial Alcalase® 2.4 L; Guerard *et al.*, (2001), quienes emplearon NaOH al 2 N para mantener el pH constante de 8.0 durante la

hidrólisis de las proteínas del estómago del atún por acción de la enzima comercial Alcalase[®] 2.4 L.

Sin embargo, su exactitud ha sido puesta en cuestión, ya que se obtienen valores más altos de grado de hidrólisis con la metodología del ácido trinitrobenzenosulfónico (Fernández y Kelly, 2016; Spellman *et al.*, 2003) y se limita a procesos proteolíticos que requieren mantener el pH en condiciones alcalinas. En este sentido, algunas correcciones al método clásico descrito por Adler-Nissen (1986) han sido realizadas por otros autores (Camacho *et al.*, 2001). Es por esto que en futuras investigaciones, se podría determinar las ventajas y limitaciones al monitorear el proceso de hidrólisis con otras metodologías, como la osmometría, viscosidad, TNBS, OPA, nitrógeno soluble, entre otros.

Un estudio realizado por Fernández, (2016) comparó el GH utilizando la metodología del pH - Stat y la metodología del ácido trinitrobenzenosulfónico TNBS, reportando que los valores del GH con TNBS fueron más altos que con pH-Stat, sobre todo en el caso de la hidrólisis utilizando la enzima comercial Protamex. Esto es debido a la especificidad de esta enzima, la cual es más amplia para los aminoácidos hidrófobos. Resultados similares han sido reportados por Spellman *et al.*, (2003).

Para las diferentes relaciones enzima sustrato (E:S), factor de dilución (D) y tiempo de reacción (t), los valores de la Cuadro 8 se obtuvieron aplicando la Ecuación (2). Se observó que el ajuste como las estimaciones de los parámetros

fueron significativos en un nivel de probabilidad del 95%. Los factores que influyen en el grado de hidrólisis en esta investigación en orden decreciente fueron: relación enzima sustrato > tiempo > factor de dilución.

4.5.1.1. Efecto de la relación enzima sustrato

Se observó una fuerte influencia positiva de la relación enzima sustrato sobre el grado de hidrólisis. Esto es debido a que con mayores relaciones de enzima sustrato, hay mayor concentración de enzima añadida a la mezcla a hidrolizar y por ende, hay más sitios activos disponibles para que los enlaces peptídicos de la masa proteica de la anchoveta pueda ser hidrolizada. El valor de grado de hidrólisis más alto (16.98%) se alcanzó con la relación enzima sustrato de 60 UA/kg, factor de dilución 0.7 kg pescado/kg agua y un tiempo de reacción de 120 min. No se encontraron reportes en la literatura usando la enzima Protamex™ y la anchoveta entera para poder comparar los valores obtenidos de grado de hidrólisis.

Se observó en la Figura 17B que la relación entre E:S y el GH no tiene un aumento lineal estricto, esto solo se cumple hasta un determinado valor de E:S, porque a partir de ciertas concentraciones de enzima añadida, el grado de hidrólisis obtenido irá disminuyéndose porque las concentraciones de enzima son excedentes.

Otros estudios sobre hidrólisis enzimática han informado de la misma tendencia; Pagán *et al.*, (2013) para la hidrólisis proteica de huesos de

chanchito y Benkajul y Morrissey (1997) para la hidrólisis proteica de bacaladilla del Pacífico, quienes trabajaron con la enzima Neutrase[®].

4.5.1.2. Efecto del factor de dilución

Se observó en la Figura 17C, una influencia negativa del factor de dilución (D) sobre el grado de hidrólisis (GH). Esto es debido a que la constante de inhibición enzimática por producto aumenta cuando se utilizan concentraciones de sustrato más altas en el proceso. Es decir, la presencia de los productos finales (péptidos entre 10-15 KDa) hace que la reacción sea más lenta, probablemente, estos péptidos ocupan temporalmente el sitio activo de la enzima por poseer una semejanza estructural con el sustrato original, o bien, estos péptidos alteran la conformación espacial de la enzima, impidiendo que un nuevo sustrato sufra hidrólisis, dando como resultado una disminución de la recuperación de proteína.

4.5.1.3. Efecto del tiempo de reacción

Se observó en las Figuras 17B y 17C una fuerte influencia positiva del tiempo de reacción (t) sobre el grado de hidrólisis (GH). Se puede observar una inflexión para un tiempo alrededor de 120 min, mostrando gráficas con mayor pendiente antes de 120 min. Después de este tiempo, aunque el GH aumente, el valor de la pendiente es menor y menos importante para el GH. No se encontraron reportes en la literatura usando

la enzima Protamex™ y la anchoveta entera para poder comparar los valores obtenidos del grado de hidrólisis.

Otros estudios sobre la hidrólisis enzimática de huesos de porcino por acción de la enzima Neutrased han informado la misma tendencia (Pagán *et al.*, 2013). En la hidrólisis de atún de aleta amarilla por acción de la enzima Alcalase por Guérard *et al.*, (2001) informó que el GH aumentó con la concentración creciente de la enzima hasta un 23%, por lo que tiempos más allá de 5.5 h no producen ninguna mejora significativa en el GH.

4.5.2. Recuperación de proteína

El valor de la recuperación de proteína utilizando el método de Diniz y Martin, (1998) varió desde 51.55% hasta 75.32% bajo variaciones sistemáticas de los niveles altos y bajos de relación enzima sustrato (E:S), factor de dilución (D) y tiempo de reacción (t).

Los efectos de los factores lineales y cuadráticos sobre la recuperación de proteínas se presentan en la Cuadro 11, donde los valores en negrita son significativos al 95% de confianza ($p \leq 0,05$).

Cuadro 11: Efecto estimado, error estándar, coeficiente t y significancia estadística para cada factor en el modelo codificado para la respuesta recuperación de proteínas

	Efecto	Error estándar	t (9)	Valor P
Media	62.768	0.295	213.084	<0.0001
E:S (L)	9.475	0.722	13.131	<0.0001
E:S (Q)	-0.581	0.531	-1.094	0.3057
D (L)	-12.319	0.722	-17.073	<0.0001
D (Q)	0.096	0.531	0.181	0.8611
t (L)	8.784	0.722	12.174	<0.0001
t (Q)	1.624	0.531	3.058	0.0156

A través de la Cuadro 11, para la respuesta recuperación de proteínas, se observa que los factores E:S (L), t (L) y t (Q) presentaron efecto positivo sobre la respuesta, es decir, el aumento de las variables E:S (L) y t (L) elevan el valor de la recuperación de proteínas, en cuanto al factor t (Q) indica un punto mínimo en la superficie. El factor D (L) presenta un efecto negativo sobre la respuesta, es decir, un aumento en esta variable causó una disminución en la recuperación de proteínas. Se observó que los factores E:S (Q) y D (Q) se consideraron no estadísticamente significativas en la respuesta recuperación de proteínas, al nivel de significancia del 5%.

Se verificó la significancia de la regresión al nivel de confianza del 95%, a través del análisis de varianza (ANOVA), utilizando el valor-p. En la Cuadro 12 se encuentran los valores calculados de p.

**Cuadro 12: Análisis de varianza del modelo ajustado para la respuesta
recuperación de proteína**

	Suma de cuadrado	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
E:S (L)	179.542	1	179.542	172.428	<0.0001
E:S (Q)	1.247	1	1.247	1.197	0.3057
D (L)	303.521	1	303.521	291.495	<0.0001
D (Q)	0.034	1	0.034	0.033	0.8611
t (L)	154.321	1	154.321	148.207	<0.0001
t (Q)	9.738	1	9.738	9.352	0.0156
Error	8.330	8	1.041		
Total	657.306	14			
R ²	0.987				

Los valores p pueden indicar cómo son los datos de incompatibles con cierto modelo estadístico. El valor-p para cada término comprueba la hipótesis nula de que el coeficiente es igual a cero (no tiene efecto). Para las variables E:S (L), D (L), t (L) y t (Q), presentaron un valor-p bajo (< 0.05) indicando que se rechaza la hipótesis nula. En otras palabras, es probable que tengan una adición significativa al modelo planteado porque los cambios en sus niveles altos y bajos de los valores en negrita presentados en la Cuadro 12 están relacionados con cambios en la variable de respuesta (recuperación de proteína).

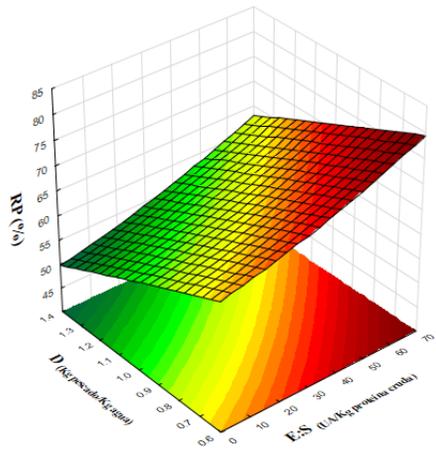
El coeficiente de determinación para el modelo ajustado fue de 0.987 para la recuperación de proteína, indicando que el modelo obtenido explica el 98.733% de la variación de los datos observados para la recuperación de proteínas. La introducción de interacciones lineales y cuadráticas no aumentó la varianza explicada en el modelo utilizado.

Por lo tanto, el modelo codificado ajustado para la respuesta recuperación de proteína, en la hidrólisis enzimática de la anchoveta entera, es:

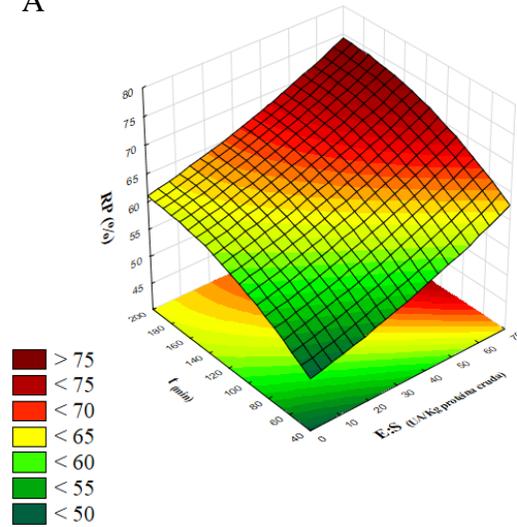
$$\text{RP (\%)} = (62219.7 + 124.4 \times \text{E:S} + 0.9 \times \text{E:S}^2 - 18399.7 \times \text{D} - 1066.1 \times \text{D}^2 + 181.5 \times \text{t} - 0.5 \times \text{t}^2) \times 10^{-3}$$

Dónde: RP es el recuperación de proteína, (%); E:S es la relación enzima sustrato, (UA / kg proteína cruda); D es el factor de dilución, (kg pescado / kg agua); t es el tiempo de reacción (minutos).

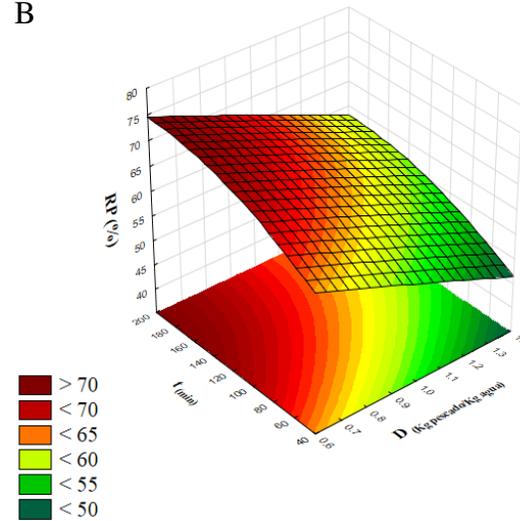
En la Figura 18, se muestra las superficies de respuesta generadas a través del modelo propuesto para la recuperación de proteína “RP”. Estas figuras expresan la interacción entre dos variables independientes sobre la respuesta, permaneciendo constante la tercera variable en el punto central. La figura 18A, expresa la interacción entre las variables ‘E:S’ y ‘D’ sobre la respuesta, permaneciendo constante la variable ‘t’ en el punto central. La figura 18B, expresa la interacción entre las variables ‘E:S’ y ‘t’ sobre la respuesta, permaneciendo constante la variable ‘D’ en el punto central. La figura 18C, expresa la interacción entre las variables ‘D’ y ‘t’ sobre la respuesta, permaneciendo constante la variable ‘E:S’ en el punto central.



A



B



C



Figura 18: Superficies de respuesta graficadas a partir del modelo de recuperación de proteínas.

La Figura 18 (A) muestra que la mayor recuperación de proteínas se obtiene utilizando una alta relación enzima sustrato y un bajo factor de dilución, siendo la relación enzima sustrato la que influye más. La Figura 18 (B) muestra que la mayor recuperación de proteínas se obtiene utilizando una alta relación enzima sustrato y mayor tiempo de reacción, siendo la relación enzima sustrato la que influye más. La Figura 18 (C) confirma la relación del tiempo de reacción y el factor de dilución en el aumento de la recuperación de proteínas.

Se usó la recuperación de proteína como un indicador del rendimiento que puede obtenerse del proceso de hidrólisis.

La temperatura óptima para Protamex™ se indica entre 35 y 60°C (Novozymes, 1998). En un estudio realizado por Liaset *et al.* (2002), determinaron que existe una fuerte correlación positiva entre la temperatura y el nitrógeno reconvertido (o recuperación de proteína), sus resultados indican que temperaturas de hidrólisis entre 50 – 56°C son de gran importancia para la recuperación de nitrógeno y es considerada como la temperatura óptima para Protamex™.

El pH óptimo para Protamex se indica que está entre 5.5 y 7.5 (Novozymes, 1998). En un estudio realizado por Liaset *et al.* (2002), determinaron que los niveles de pH tuvieron poca influencia en el nitrógeno reconvertido (o recuperación de proteína), pero es importante tener en cuenta que el intervalo de pH estudiado fue bastante estrecho (5.4 – 7.7) y probablemente de haberse

experimentado en un rango más amplio, el factor de pH habría sido de mayor influencia.

Liaset *et al.* (2002), estudió el efecto del pH entre 5.4 a 7.7, la temperatura entre 36 a 50°C, el factor de dilución entre 0.71 a 1.21 kg pescado/ kg agua y la relación enzima sustrato entre 30 a 90 UA/kg proteína cruda sobre la hidrólisis enzimática del salmón con la enzima comercial Protamex™. Como resultado, los autores concluyeron que los factores que influyen en la recuperación de proteína en esta investigación en orden decreciente fueron: relación enzima sustrato (E:S) > factor de dilución (D) > temperatura > pH.

Holanda (2004), estudió el efecto de la temperatura entre 45.9 a 74.1°C y la concentración enzima sustrato entre 0.18 a 5.83 % (p/p) sobre el grado de hidrólisis y la recuperación de proteína en la hidrólisis de residuos de camarón por acción de la enzima comercial Alcalasa®. Los parámetros temperatura (Q) y concentración enzima sustrato (L) fueron los que tuvieron mayor efecto sobre las variables de respuesta. A la vez, concluyeron que la región óptima del proceso enzimático se obtenía a concentraciones enzima sustrato de 2.5 a 5.5% y temperatura de 55 a 65 °C.

Martins da Silva (2011), estudió el efecto del pH entre 6.7 a 8.3, la concentración enzima sustrato entre 0.48 a 5.52 % (p/p) y la temperatura entre 46 a 64 °C sobre la recuperación de la proteína en la hidrólisis de mejillón por acción de la enzima comercial Protamex™. El autor concluyó que el factor concentración enzima sustrato (L) presentó un efecto positivo en la

recuperación de proteínas, mientras que el factor concentración enzima sustrato (Q) presentó efecto negativo, indicando un punto máximo en la superficie; los factores pH (L) y pH (Q) presentaron un efecto positivo sobre la respuesta a la recuperación de proteínas.

Para las diferentes relaciones enzima sustrato (E:S), factor de dilución (D) y tiempo de reacción (t), los valores de la Cuadro 8 se obtuvieron aplicando la Ecuación (5). Se observó que el ajuste como las estimaciones de los parámetros fueron significativos en un nivel de probabilidad del 95%. Los factores que influyen en la recuperación de proteína en esta investigación en orden decreciente fueron: factor de dilución (D) > relación enzima sustrato (E:S) > tiempo (t).

4.5.2.1. Efecto de la relación enzima sustrato

Se observó en las figuras 18A y 18B una fuerte influencia positiva de la relación enzima sustrato (E:S) sobre la recuperación de proteína (RP). No se encontraron reportes en la literatura usando la enzima Protamex™ y la anchoveta entera para poder comparar los valores obtenidos de recuperación de proteína.

Otros estudios sobre hidrólisis enzimática han informado de la misma tendencia (Mohr V., 1977; Langmyhr E., 1981; Hevia *et al.*, 1976; Rebeca *et al.*, 1991; Diniz y Martin, 1997; Diniz y Martin, 1998; Liaset *et al.*, 2002). Esto es debido a que con mayores concentraciones de enzima, existen más sitios activos disponibles para hidrolizar al sustrato.

En un estudio realizado por Liaset *et al.* (2002), al aumentar la relación enzima sustrato de 30 a 60 UA/kg de proteína cruda en condiciones de hidrólisis iguales, el nitrógeno reconvertido aumentó de 55.8 ± 0.4 % a 64.0 ± 1.9 %, es decir, un aumento absoluto del 8.2%. Sin embargo, al aumentar la proporción E:S de 60 a 90 UA/kg de proteína cruda, el nitrógeno reconvertido tuvo solo un incremento absoluto del 4.0%.

Cabe resaltar que el intervalo de E:S estudiado fue entre 10 a 60 UA/kg proteína cruda y probablemente de haberse experimentado en un rango más amplio, el factor de E:S habría sido de mayor influencia en la recuperación de proteína. A pesar de esto, la relación entre E:S y la RP no tiene un aumento lineal estricto (Figuras 18A y 18B), esto solo se cumple hasta un determinado valor de E:S, porque a partir de ciertas concentraciones de enzima añadida, la ganancia en la recuperación de proteína irá disminuyéndose porque las concentraciones de enzima son excedentes.

4.5.2.2. Efecto del factor de dilución

Se observó en las figuras 18A y 18C una fuerte influencia negativa del factor de dilución (D) sobre la recuperación de proteína (RP). Otros estudios sobre hidrólisis enzimática han informado de la misma tendencia (Hale, M., 1969; Mohr, V., 1977; Cheftel *et al.*, 1971 y Liaset *et al.*, 2002). Esto se debe que a mayor concentración de sustrato (mayor factor de dilución) se incrementa la inhibición de la enzima por formación de

productos. Debido a este hecho, las industrias deben alcanzar la mayor recuperación de proteína para incrementar el rendimiento del producto final, sin embargo, esto implicaría llevar a cabo el proceso de hidrólisis utilizando una mayor masa de agua en vez de pescado, que como consecuencia, aumentará el costo del proceso para concentrar o secar el hidrolizado.

4.5.2.3. Efecto del tiempo de reacción

Se observó una influencia positiva del factor tiempo sobre la recuperación de proteína (RP). El valor de recuperación de proteínas más alto (75.32%) se alcanzó con la relación enzima sustrato de 60 UA/kg, factor de dilución 0.7 kg pescado/kg agua y un tiempo de reacción de 120 min. No se encontraron reportes en la literatura usando la enzima Protamex™ y la anchoveta entera para poder comparar los valores obtenidos de recuperación de proteína.

En un estudio realizado por Liaset *et al.* (2002), evaluaron la influencia del tiempo de hidrólisis sobre el nitrógeno reconvertido (o recuperación de proteína) en las condiciones ambientales óptimas de la enzima Protamex™, la cantidad de nitrógeno soluble en el salmón picado antes de la hidrólisis fue $24.0 \pm 0.4\%$, después de un tiempo de 30 min de reacción enzimática para las E:S de 10, 20, 30, 60 y 90 UA/kg de proteína cruda fueron 40.0 ± 1.0 , 42.0 ± 0.1 , 46.1 ± 0.2 , 49.8 ± 0.1 y $54.8 \pm 0.3\%$, respectivamente. Después de 60 minutos, había aumentado a 43.2 ± 0.7 , 47.3 ± 0.8 , 49.6 ± 0.7 , 57.0 ± 1.0 y $61.0 \pm 0.7\%$. A un tiempo

de 120 minutos, sólo aumentó entre 0.1 – 2.6% para todas las relaciones E:S ensayadas.

Como se puede observar en la Figuras 18B, la influencia del tiempo sobre la recuperación de proteína no tiene un aumento lineal, esto solo se cumple hasta un determinado valor de tiempo, porque a partir de ciertos minutos de reacción enzimática, el incremento en la recuperación de proteína irá disminuyendo gradualmente porque parte de los péptidos solubles se van uniendo a la fase oleosa formándose una lipoproteína (emulsión). Una capa gruesa (emulsión) entre la fase oleosa y la fase acuosa se va incrementando mientras transcurre la hidrólisis enzimática (Figura 19). Esta capa, también informó Liaset *et al.*, (2003) en la hidrólisis de salmón por acción de la enzima Protamex™; Liu *et al.*, (2014) en la hidrólisis de sub productos del surimi por acción de la enzima Protamex™. Esta suposición también se apoya en los resultados informados por Kristinsson y Rasco (2000); Liaset *et al.*, (2000) y Liaset *et al.*, (2002).



Figura 19: Formación de emulsión en el transcurso de la hidrolisis.

4.5.3. Distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos

El valor de la distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos utilizando el método de electroforesis SDS-PAGE varió desde 9.00 a 14.43 KDa bajo variaciones sistemáticas de los niveles altos y bajos de relación enzima sustrato (E:S), factor de dilución (D) y tiempo de reacción (t).

Los efectos de los factores lineales y de las interacciones cuadráticas sobre la distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos se presentan en la Cuadro 13, donde los valores en negrita son significativos al 95% de confianza ($p \leq 0.05$).

Cuadro 13: Efecto estimado, error estándar, coeficiente t y significancia estadística para cada factor en el modelo codificado para la respuesta distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos

	Efecto	Error estándar	t (9)	Valor P
Media	11.957	0.117	102.289	<0.0001
E:S (L)	-2.472	0.298	-8.293	<0.0001
E:S (Q)	0.701	0.219	3.207	0.0149
D (L)	-1.163	0.314	-3.703	0.0076
t (L)	0.756	0.314	2.406	0.0470
t (Q)	0.682	0.219	3.120	0.0168
E:S²×D	0.802	0.298	2.691	0.0310
E:S²×t	-1.154	0.298	-3.872	0.0061

A través de la Cuadro 13, para la respuesta, distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos, se observa que los factores E:S (Q), t (L), t (Q) y E:S²×D presentaron un efecto directamente proporcional en la respuesta, es decir la disminución de las variables t (L) y E:S²×D generan péptidos de menor peso molecular, mientras que el factor E:S (Q) y t (Q) indican un punto mínimo en la superficie. Los factores E:S (L), D(L) y E:S²×t presentaron un efecto inversamente proporcional sobre la respuesta, es decir, un aumento en estas variables generan péptidos de menor peso molecular.

Se verificó la significancia de la regresión al nivel de confianza del 95%, a través del análisis de varianza (ANOVA), utilizando el valor-p. En la Cuadro 14 se encuentran los valores calculados de p.

**Cuadro 14: Análisis de varianza del modelo ajustado para la respuesta
distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos**

	Suma de cuadrado	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor F	Valor p
E:S (L)	12.217	1	12.217	68.778	0.000
E:S (Q)	1.827	1	1.827	10.287	0.015
D (L)	2.436	1	2.436	13.714	0.008
t (L)	1.028	1	1.028	5.787	0.047
t (Q)	1.730	1	1.730	9.737	0.017
E:S²×D	1.286	1	1.286	7.242	0.031
E:S²×t	2.663	1	2.663	14.995	0.006
Error	1.243	7	0.178		
Total	22.610	14			
R ²	0.945				

Los valores p pueden indicar cómo son los datos de incompatibles con cierto modelo estadístico. El valor-p para cada término comprueba la hipótesis nula de que el coeficiente es igual a cero (no tiene efecto). Para las variables E:S (L y Q), D (L), t (L y Q) y los efectos E:S² × D y E:S² × t, presentaron un valor-p bajo (< 0.05) indicando que se rechaza la hipótesis nula. En otras palabras, es probable que tengan una adición significativa al modelo planteado porque los cambios en sus niveles altos y bajos de los valores en negrita presentados en la Cuadro 14 están relacionados con cambios en la variable de respuesta (distribución aparente del peso molecular).

El coeficiente de determinación para el modelo ajustado fue de 0.945 para la distribución del peso molecular, indicando que el modelo obtenido explica el 94.501% de la variación de los datos observados para la distribución del peso

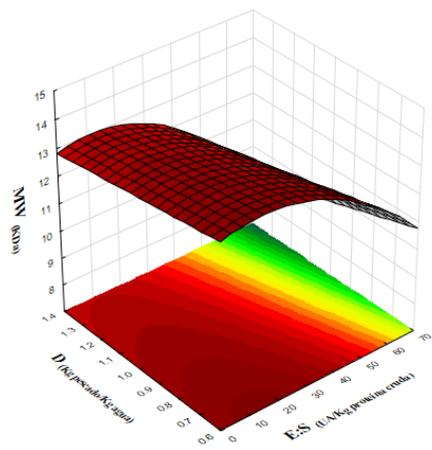
molecular. La introducción de interacciones cuadráticas aumentó la varianza explicada en el modelo utilizado.

Por lo tanto, el modelo codificado ajustado para la distribución molecular aparente de los péptidos obtenidos, en la hidrólisis enzimática de la anchoveta entera, es:

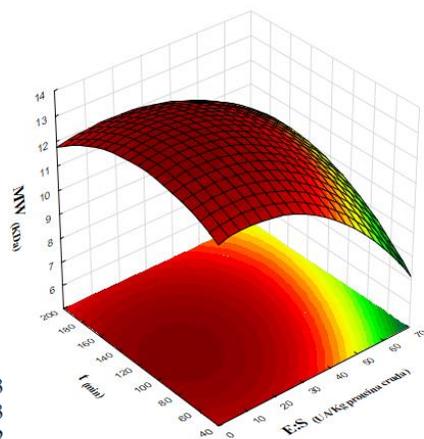
$$\text{MW (KDa)} = (11962.6 + 29.13 \times \text{E:S} - 1.34 \times \text{E:S}^2 - 1039.8 \times \text{D} + 42.01 \times \text{t} - 0.19 \times \text{t}^2 - 0.29 \times \text{E:S}^2 \times \text{D}) \times 10^{-3}$$

Dónde: MW es peso molecular, (KDa); E:S es la relación enzima sustrato, (UA / kg proteína cruda); D es el factor de dilución, (kg pescado / kg agua); t es el tiempo de reacción (minutos).

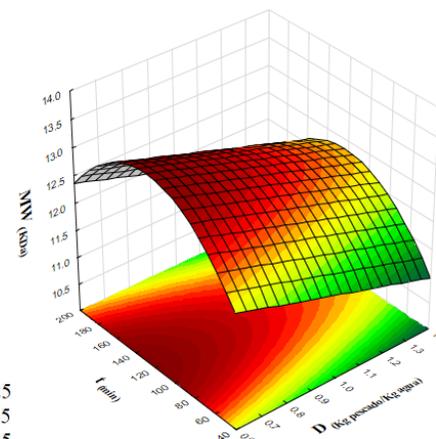
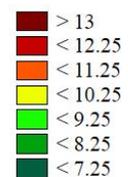
En la Figura 20, se muestra las superficies de respuesta generadas a través del modelo propuesto para la distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos “MW”. La figura 20A, expresa la interacción entre las variables ‘E:S’ y ‘D’ sobre la respuesta, permaneciendo constante la variable ‘t’ en el punto central. La figura 20B, expresa la interacción entre las variables ‘E:S’ y ‘t’ sobre la respuesta, permaneciendo constante la variable ‘D’ en el punto central. La figura 20C, expresa la interacción entre las variables ‘D’ y ‘t’ sobre la respuesta, permaneciendo constante la variable ‘E:S’ en el punto central.



A



B



C



Figura 20: Superficies de respuesta graficadas a partir del modelo de distribución del peso molecular.

La Figura 20 (A) muestra que se obtienen péptidos de menor peso molecular utilizando una alta relación enzima sustrato y un alto factor de dilución, siendo la relación enzima sustrato la que influye más. La Figura 20 (B) muestra que el menor peso molecular se obtiene utilizando una alta relación enzima sustrato y un menor tiempo de reacción, siendo la relación enzima sustrato la que influye más. La Figura 20 (C) muestra que se obtienen péptidos de menor peso molecular utilizando un alto factor de dilución y a tiempos menores de 60 minutos y mayores a 180 minutos.

Se determinó la distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos, con la finalidad de lograr el máximo rendimiento del producto final en el proceso completo de obtención de aislado proteico de pescado, el cual consta de péptidos de peso molecular entre 10 a 1KDa. Debido a que en este rango, se pueden aprovechar mejor las propiedades nutricionales y tecnológicas de las proteínas. La distribución del peso molecular de los hidrolizados de proteínas es una de las propiedades más importantes, que tiene una influencia directa en sus aplicaciones como alimentos funcionales (Zheng *et al.*, 2006).

Para las diferentes relaciones enzima sustrato (E:S), factor de dilución (D) y tiempo de reacción (t), los valores del peso molecular aparentes mostrados en la Cuadro 8 se obtuvieron utilizando el software CLIQS VERSION 1.1 DEMO, analizando los geles de electroforesis SDS-PAGE. Se observó que el ajuste como las estimaciones de los parámetros fueron significativos en un nivel de probabilidad del 95%. Los factores que influyen en la distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos en esta investigación en orden

decreciente fueron: relación enzima sustrato > factor de dilución > tiempo de reacción.

Los perfiles electroforéticos de los hidrolizados de anchoveta entera por acción de la enzima Protamex™ son presentados en las figuras 21 y 22.

En la figura 21 las columnas 1 y 10 representan los marcadores de peso molecular; las columnas entre (2 – 9) indican las 8 primeras experiencias, y para la figura 22 las columnas 1 y 9 representan los marcadores de peso molecular; las columnas entre (2 – 8) indican las siguientes 7 experiencias.

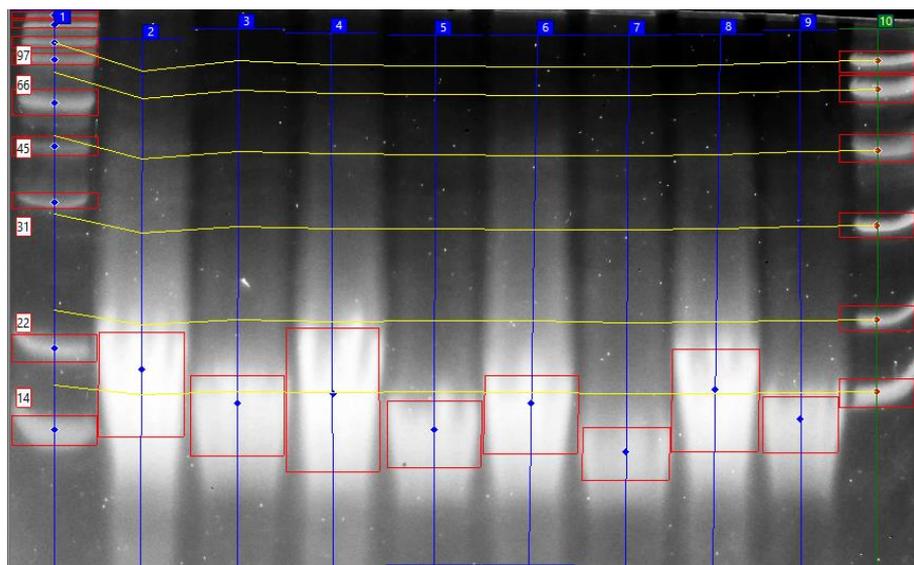


Figura 21: Perfil electroforético SDS-PAGE, gel al 15% para las primeras 8 experiencias.

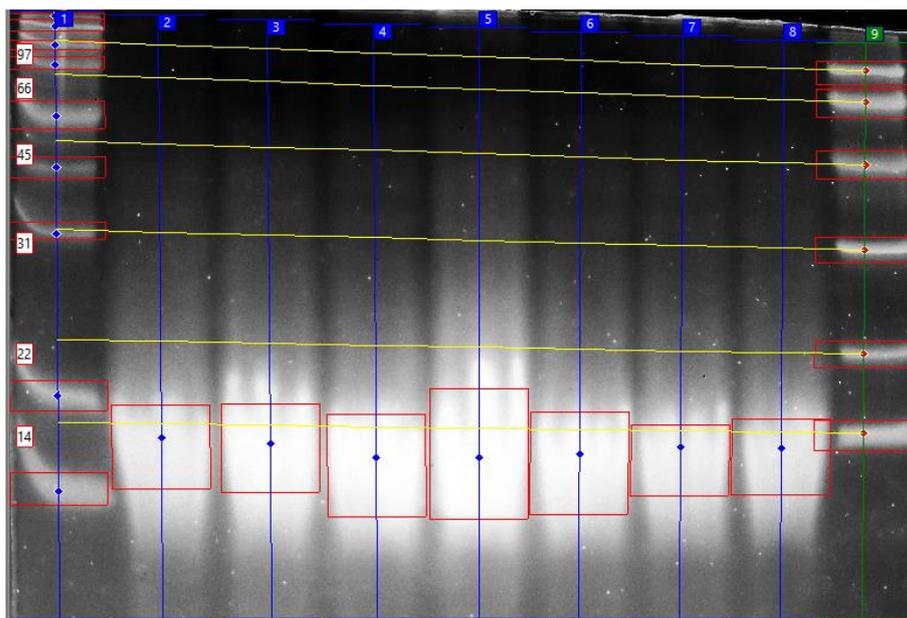


Figura 22: Perfil electroforético SDS-PAGE, gel al 15% para las ultimas 7 experiencias.

En la figura 21 y 22 se puede observar que la hidrólisis proteica por acción de la enzima Protamex™ a diferentes tratamientos de hidrólisis produjeron perfiles de péptidos ampliamente similares, entre 9 y 14 KDa. El mismo resultado fue reportado por Fernandez y Kelly, (2016). Hay que tener en consideración que los péptidos mas pequeños tienen a perderse durante el proceso de fijación, tinción y destinción en la metodología de electroforesis SDS-PAGE.

Liu *et al.*, (2000) estudió el hidrolizado obtenido por Protamex con un grado de hidrólisis al 10%, determinando que presentaba una proporción de moléculas grandes con Mw de 150 KDa, pero también contenían péptidos con MW de 2.5 KDa en menor proporción.

Klompong *et al.*, (2007) comparó los pesos moleculares de dos hidrolizados al mismo grado de hidrólisis por acción de las enzimas Alcalase y Protamex, determinado que la enzima Protamex obtiene péptidos de mayor tamaño molecular, lo que podría estar asociado por presentar una menor actividad enzimática.

En un estudio realizado por García-Moreno *et al.*, (2016), determinó que el contenido de péptidos de gran peso molecular (> 9.3 kDa) tiene una relación inversamente proporcional con el GH del hidrolizado de músculo de sardina por acción de la enzima subtilisina. Al aumentar el GH se incrementa la concentración de péptidos entre $0.3 - 9.3$ KDa. Sin embargo, el contenido de péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos (<0.3 kDa) aumentó para hidrolizados con menor GH. Este hallazgo, hace que el autor llegue a la conclusión que a medida que se liberan los primeros péptidos solubles, la enzima subtilisina tiene una baja preferencia por cualquier resto de aminoácido como sitio de escisión, por lo que hidroliza a péptidos más cortos antes de degradar una proteína más intacta.

En la hidrólisis de proteínas de los sub productos de tilapia por acción de la enzima comercial Alcalase, la caracterización de los pesos moleculares de los péptidos obtenidos mostró la presencia de bandas fuertes que oscilaban entre 3.5 a 26.6 kDa, lo que indicaba que la enzima era capaz de producir péptidos de pequeño tamaño en 120 minutos (Roslan *et al.*, 2014). Varios estudios han demostrado la capacidad de la alcalasa para producir péptidos de bajo peso

molecular mediante un alto grado de hidrólisis (Benjakul y Morrissey, 1997, Liaset *et al.*, 2000).

En la hidrólisis de proteínas del atún de aleta amarilla por acción de la enzima Alcalase, la distribución aparente del peso molecular en los péptidos obtenidos tuvieron una relación inversamente proporcional con la relación enzima sustrato, obteniendo pesos moleculares que oscilaban entre 6500 Da y aminoácidos libres en la máxima relación enzima sustrato (Guerard *et al.*, 2001).

4.5.3.1. Efecto de la relacion enzima sustrato

Se observó en las Figuras 20A y 20B una fuerte influencia negativa de la relación enzima sustrato sobre la distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos. Es decir, que los péptidos de menor peso molecular se obtienen a altas cantidades de enzima añadida. Esto es debido a que con mayores E:S, hay una mayor cantidad sitios activos disponibles para que los enlaces péptidicos sean escindidos.

4.5.3.2. Efecto del factor de dilución

Se observó en la Figura 20C una fuerte influencia negativa del factor de dilución sobre la distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos. Es decir, los péptidos de menor peso molecular se obtienen a mayor factor de dilución. Esto es debido a que al haber mayor cantidad

de pescado, probablemente se libera mayor concentración de péptidos solubles y la enzima Protamex™ hidroliza a péptidos más cortos antes de degradar una proteína mas intacta.

4.5.3.3. Efecto del tiempo de reacción

Se observó en las Figuras 20B y 20C una influencia positiva del tiempo de reacción sobre la distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos. Se puede observar una inflexión para un tiempo alrededor de 120 minutos. Es decir, en los primeros minutos de reacción proteolítica, se aprovecha la máxima actividad de la enzima Protamex™ por lo que se obtienen péptidos de menor peso molecular; sin embargo al incrementar el tiempo, su actividad disminuye, por lo que ya no logra cortar péptidos pequeños sino péptidos medianos. Y apartir de 120 minutos ya no existe diferencia significativa en el peso molecular, es decir corta todo por igual.

4.6.OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La optimización del proceso de hidrólisis de proteínas de la anchoveta por acción de la enzima comercial Protamex™ tuvo la finalidad de maximizar los valores de grado de hidrólisis y de recuperación de proteína, así como obtener el menor valor de la distribución aparente del peso molecular de los péptidos obtenidos. Para ello se hizo el análisis estadístico del perfil de deseabilidad para las tres respuestas, el cual se muestra en la figura 23.

En la primera columna de la Figura 23, se observa que el mayor valor del grado de hidrólisis, mayor valor de recuperación de proteína y menor valor del peso molecular de los péptidos obtenidos coinciden para una relación enzima sustrato (E:S) de 60 UA/kg proteína cruda. Al analizar la segunda columna de la Figura 23, el punto con los mayores valores de las respuestas: GH (%) y RP (%), y menor valor del MW (KDa) se encuentran a un factor de dilución (D) de 0.7 kg pescado / kg de agua. En la tercera columna de la Figura 23, se observa que el mayor valor del grado de hidrólisis, mayor valor de recuperación de proteína y menor valor del peso molecular de los péptidos obtenidos coinciden para un tiempo de reacción (t) de 90 minutos.

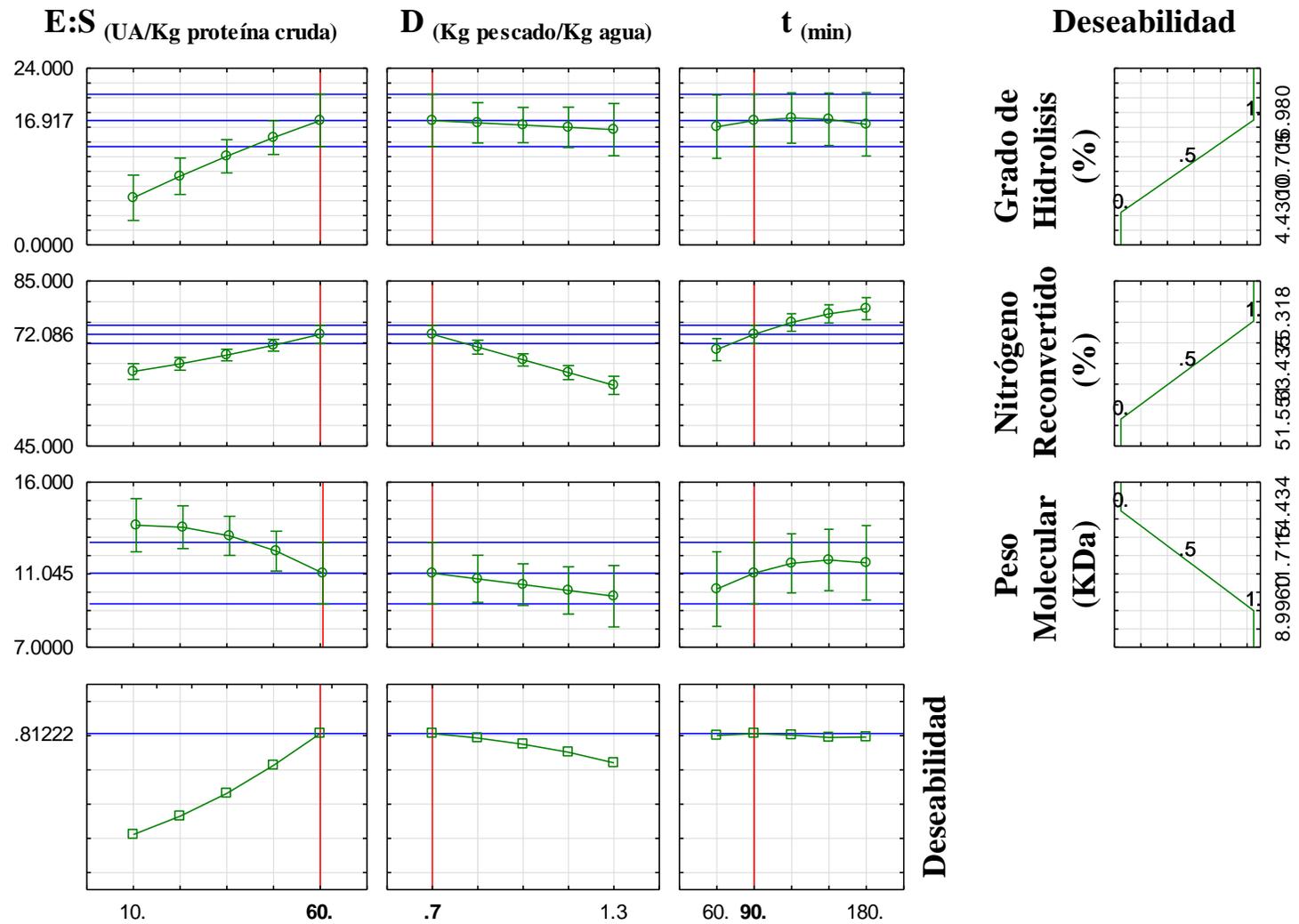


Figura 23: Perfil del valor de deseabilidad para maximizar el valor del grado de hidrólisis y la recuperación de proteína.

Por lo tanto, la siguiente combinación de las variables de reacción se sugiere: relación enzima sustrato de 60 UA/kg proteína cruda, factor de dilución de 0.7 kg pescado / kg agua y tiempo de reacción de 90 min, condiciones en que el grado de hidrólisis obtenido fue del 16.917%, la recuperación de proteína del 72.086% y una peso molecular del péptido obtenido de 11.045 KDa.

4.7.IDENTIFICACIÓN DEL MECANISMO DE REACCIÓN

En la mayoría de procesos enzimáticos se observa que el valor del grado de hidrólisis aumenta con el tiempo, siendo la velocidad mayor en las etapas iniciales y tiende a un valor constante con el tiempo. Para explicar esta característica, existen 3 posibles causas: disminución de la concentración de sustrato o enlaces peptídicos, inhibición por la formación de productos e inactivación térmica de la enzima.

Para estudiar el mecanismo de reacción de la hidrólisis enzimática de la anchoveta entera, usando la enzima comercial Protamex™, se realizaron algunos experimentos adicionales, usando diferentes concentraciones iniciales de sustrato ($S_0 = 8.918; 17.837; 26.755; 35.674; 44.592; 53.511; 62.429; 71.347; \text{ y } 80.266$ g pescado/L), la cantidad empleada de enzima en todas las pruebas fue constante ($e_0 = 24$ mUA) y en cuanto a las condiciones ambientales de reacción, se llevó a cabo a 55°C y 7.5 de pH.

4.7.1. Hipótesis 1: agotamiento de los enlaces peptídicos

Se consideró el modelo cinético con la inhibición de sustrato descrito en la ecuación 8 por referencia de otros autores (Marquez-Moreno *et al.*, 1993; Wei y Zhimin, 2006; Trusek-Holownia, 2008; Valencia *et al.*, 2014) y se confirmó en este estudio para determinar las constantes cinéticas.

En este trabajo, la concentración de sustrato se definió en términos de concentración de enlaces peptídicos (mM). El valor de conversión utilizado fue de 8.09 mmol/g de proteína, tomado de bibliografía (Adler-Niessen, 1986). Debido a que las concentraciones de sustrato usadas en los experimentos variaron entre 1.24 a 11.12 g/L de proteína cruda, las concentraciones de enlaces peptídicos fueron entre 10 y 90 mM, respectivamente.

Los resultados de la velocidad de hidrolisis inicial frente a la concentración de sustrato se utilizaron para determinar las constantes de Michaelis-Menten a 55°C mediante una regresión no lineal aplicando el método de estimación Quasi-Newton, como se muestra en la figura 24.

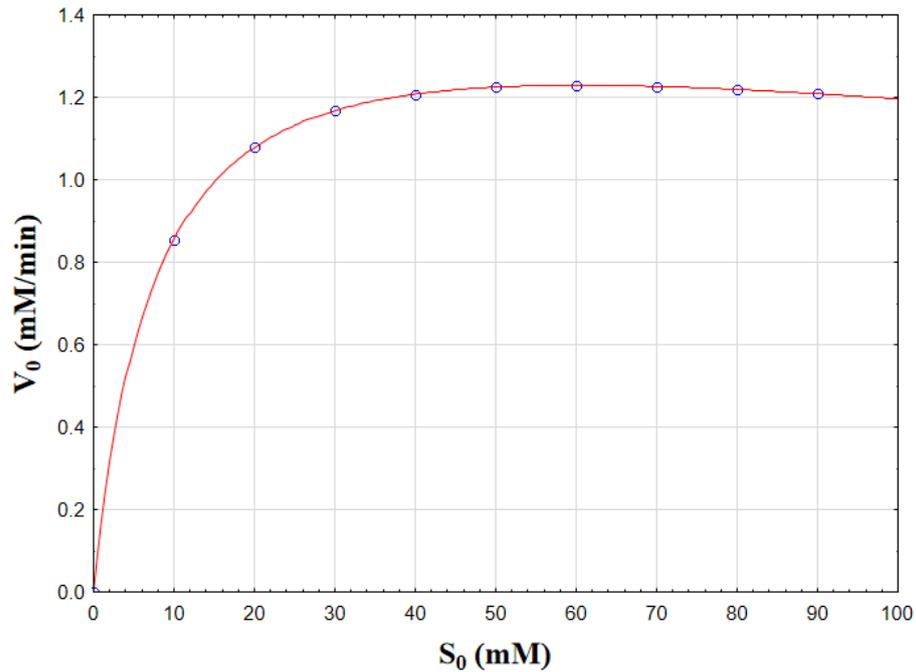


Figura 24: Velocidad inicial de hidrólisis de proteínas de anchoveta entera por acción de la enzima comercial Protamex™ frente a la concentración de enlaces peptídicos. Puntos provienen de datos experimentales y la línea continua proviene a la regresión no lineal.

Se observa en la Cuadro 15 que las constantes cinéticas V_{\max} y K_m utilizando la anchoveta entera por acción de la enzima comercial Protamex fueron de 0.1921 g/L.min y 7.9487 g/L, respectivamente. Si comparamos estos resultados con las constantes cinéticas utilizando caseína como sustrato (V_{\max} de 0.077 g/L.min y K_m de 26.175 g/L) a las mismas condiciones ambientales, se demuestra que: La velocidad de reacción es mayor cuando toda la enzima se encuentra unida a la anchoveta en vez de la caseína, debido a que la caseína es un sustrato puro, en cambio la anchoveta es un sustrato complejo ya que presenta mayor diversidad de enlaces peptídicos a ser hidrolizados durante la reacción como los residuos aromáticos (Phe, Trp, Tyr), ácidos (Glu), azufre (Met), alifáticos (Leu, Ala), hidroxilo (Ser) y básicos (Lys). La afinidad que tiene la Protamex con la anchoveta entera es mayor que con caseína. Por lo

tanto, se puede comprobar que esta enzima está diseñada para hidrolizar sustratos complejos como en este caso, la anchoveta entera.

Cuadro 15: Constantes cinéticas para la hidrólisis de proteínas de anchoveta entera por acción enzima comercial Protamex™ a 55 °C para la curva de la figura 24

Constantes cinéticas		Temperatura
		55 °C
V _{max}	mM/min	1.5540
	g/L.min	0.1921
K _m	Mm	7.9487
	g/L	0.9825
K _s	mM	456.0061
	g/L	56.3666
V _{max} /K _m		0.1955

Valencia *et al.*, (2014) reportó las constantes cinéticas para la hidrólisis del musculo del salmón, por acción de la enzima comercial Alcalase, donde obtuvo un V_{max} (mM/min), K_m (mM), K_s (Mm) y V_{max}/K_m de 1.07, 6.54, 575 y 43x10⁻³, respectivamente a 50 °C. Observó una relación directamente proporcional entre V_{max} y K_m con la temperatura de reacción, sin embargo la constante de inhibición por sustrato K_s es inversamente proporcional, lo que indica que la inhibición de sustrato es fuerte a temperaturas más elevadas.

Con los datos obtenidos es posible determinar si la curva de hidrólisis se produce por agotamiento de sustrato. Para este propósito, la conversión de sustrato se simula utilizando las constantes cinéticas presentadas en la Cuadro 15. Los resultados mostrados en la figura 25 indican que para S₀/K_m de 1 a 11.43, las curvas de conversión no mostraron la curvatura típica observada

durante la hidrólisis enzimática de proteínas y demuestra que cuando S_0/K_m es igual a 11.43 la curva simulada tiene casi la misma velocidad inicial como la curva experimental en los primeros puntos, sin embargo, después de este punto la pendiente de la curva experimental disminuye progresivamente, lo que sugiere rechazar la hipótesis planteada. Estos mismos resultados fueron reportados por Valencia *et al.*, 2014.

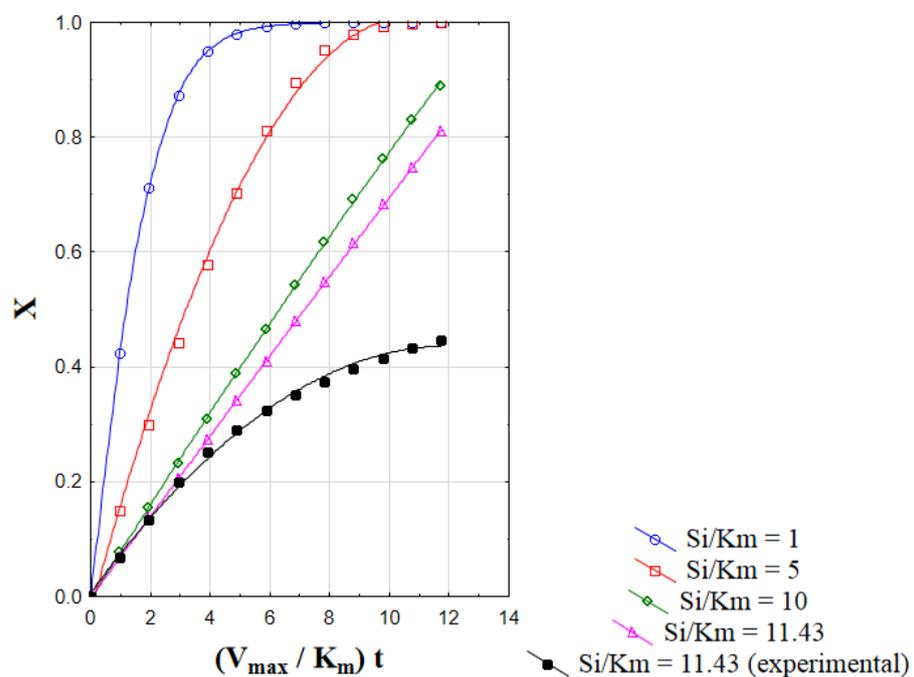


Figura 25: Simulaciones del grado de conversión (X) frente al tiempo adimensional para la hidrólisis de la proteína de anchoveta entera por acción de la enzima Protamex™ para diferentes relaciones S_0 / K_m iniciales utilizando el modelo desarrollado a partir de la ecuación 8, junto con los datos experimentales.

4.7.2. Hipótesis 2: inhibición por producto

La inhibición por producto fue evaluado para determinar el tipo de inhibición (i. competitiva, i. no competitiva e i. mixta) que se presenta para hidrólisis de proteínas de la anchoveta entera por acción de la enzima Protamex. Los

experimentos se realizaron a 55°C a un pH de 7.5, la gráfica de Lineweaver-Burk se muestra en la figura 26 y se utilizó para discriminar entre los tipos de inhibición, y una vez establecida, determinar las constantes de inhibición.

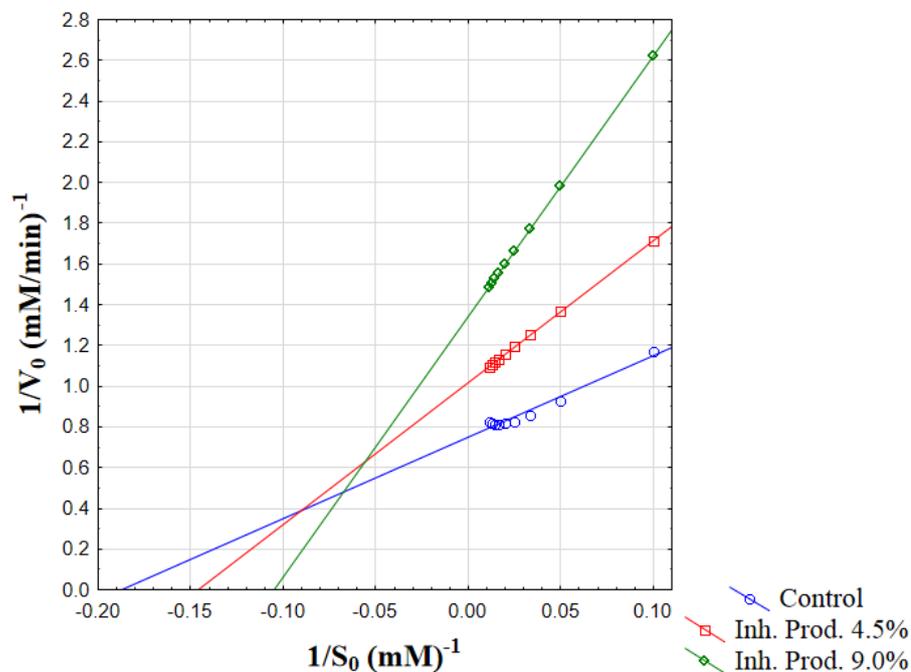


Figura 26: Pendientes de Lineweaver-Burk.

A partir de la Figura 26 se observó una inhibición mixta. Las pendientes e intersecciones de cada línea se muestran en la Cuadro 16.

Cuadro 16: Pendientes e intercepciones de las gráficas de Lineweaver-Burk de la figura 26

Hidrolizado	Concentración (mM)	Pendiente (m)	Intercepto (b)
Control	0.000	3.999	0.749
GH 5%	6.110	6.976	1.019
	12.220	12.767	1.343

La pendiente (m) y el intercepto (b) de la gráfica de Lineweaver-Burk fueron nuevamente graficados con la concentración del producto de hidrolisis (I) utilizando la ecuación 12 y 13. Las constantes cinéticas obtenidas se muestran en la Cuadro 17 incluyendo las constantes de inhibición para el componente competitivo (K_i) y para el componente no competitivo (K'_i).

Cuadro 17: Constantes cinéticas obtenidas a partir de las ecuaciones 12 y

13

Constantes cinéticas		GH 5%
V_{\max}	mM/min	1.351
	g/L.min	0.167
K_m	mM	4.770
	g/L	0.590
K_i	mM	4.920
	g/L	0.608
K'_i	mM	15.228
	g/L	1.882

Valencia *et al.*, (2014) afirma que las constantes de inhibición K_i y K'_i son mayores para grados de hidrolisis al 20% que para grado de hidrolisis al 5%, es decir, los péptidos más grandes tienen un efecto inhibidor mayor que los pequeños. Sin embargo, el efecto inhibidor no es necesariamente más fuerte para GH 5% que para GH 20% porque también depende de la concentración del producto.

La constante de inhibición competitiva por producto (K_i) y la constante de inhibición no competitiva por producto (K'_i) son mayores a la constante de Michaelis – Menten (K_m), es decir, que la formación del complejo enzima inhibidor es favorecida a expensas del complejo enzima sustrato. Los valores

de las constantes de inhibición indican claramente una fuerte inhibición causada por los productos de hidrólisis en la fase inicial de la reacción enzimática.

Resultados similares se han obtenido por Valencia *et al.*, (2014) utilizando la misma metodología de nuestra investigación. Este hallazgo también fue sugerido por Rebeca *et al.*, (1991); aunque no obtuvieron las pruebas necesarias para probar esta hipótesis. En los artículos publicados por Apar y Osbek, (2007) y Demirhan *et al.*, (2011), se encontró que la inhibición se ejerció por producto de hidrolisis de proteínas. Sin embargo, el valor de K_i se calculó como un porcentaje del volumen del hidrolizado y el valor del K_m se calculó como un porcentaje de la masa de proteína utilizada en la mezcla de reacción. Por lo tanto estos valores no pueden ser comparados para validar la hipótesis de Rebeca *et al.*, (1991).

Para demostrar el efecto de la inhibición por producto se llevó a cabo una simulación utilizando la constante cinética para el hidrolizado GH 5%. En la figura 27 la simulación del modelo cinético presentado en la ecuación 8 fue graficado con y sin inhibición.

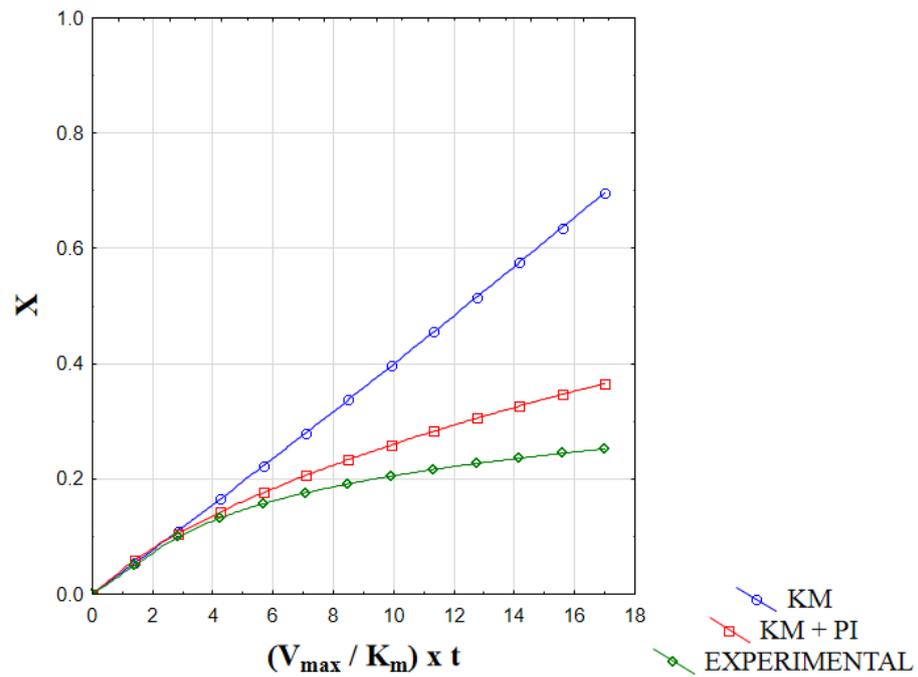


Figura 27: Simulaciones del grado de conversión (X) frente al tiempo adimensional (líneas) para la hidrólisis de proteína de anchoveta entera por la enzima Protamex™ basada en el modelo cinético (KM) en la ecuación 8 y considerando la inhibición del producto (PI) junto con los datos experimentales.

Como se muestra en la figura 27 el efecto de la inhibición por producto es responsable de la forma típica de la curva de hidrólisis, ya que la simulación sigue la tendencia de los datos experimentales. Por lo tanto la hipótesis de la inhibición por producto como una explicación de la forma de la curva de la hidrólisis es consistente con la evidencia experimental obtenida en el presente estudio, aceptando la hipótesis planteada.

4.7.3. Hipótesis 3: inactivación térmica de la enzima

La tercera hipótesis probada en este trabajo fue la inactivación térmica de la enzima durante la reacción de hidrólisis. Para llevar a cabo este experimento,

se determinó la actividad de hidrólisis enzimática como una función del tiempo a 55°C.

Los resultados mostrados en la Figura 28 (A) indican claramente que la enzima comercial Protamex™ es mucho más estable registrándose un aumento en la vida media de 65 minutos a 201 minutos y 312 minutos en presencia de 10 mM y 90 mM de concentración de sustrato, respectivamente. El mismo resultado mostrado en la Figura 28 (B) se obtuvo con la enzima comercial Protamex™ en presencia de productos de hidrólisis. Sin embargo, los productos de hidrólisis, GH al 5%, dan menos estabilización que los sustratos a las mismas concentraciones de grupos α -NH, tal como se muestra en la Cuadro 18.

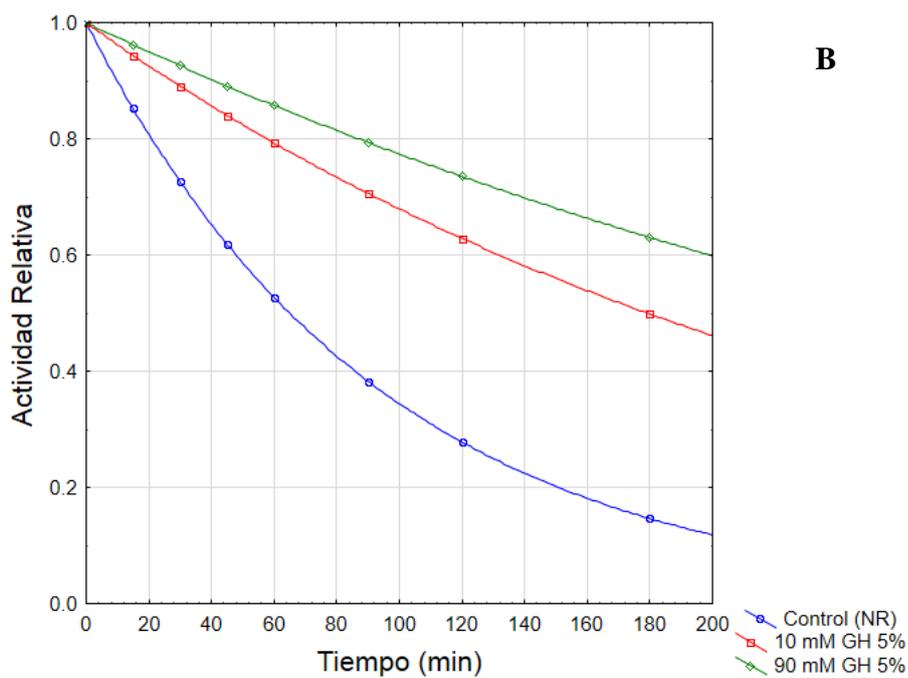
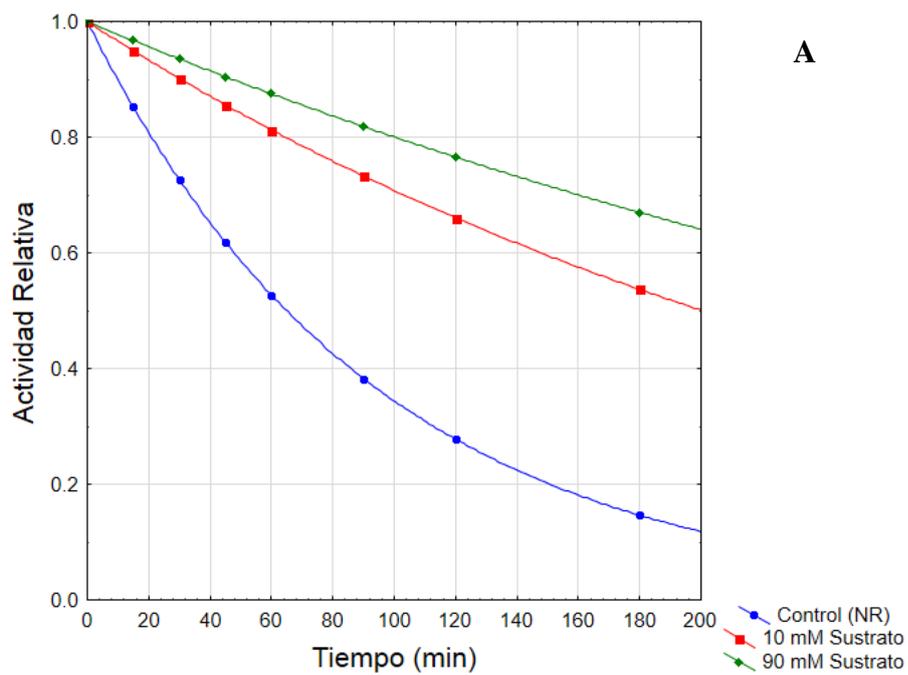


Figura 28: Inactivación termina de la enzima comercial Protamex™ a una temperatura de 55 °C en condiciones reactivas y no reactivas con diferentes concentraciones de sustratos y producto hidrolizado.

Cuadro 18: Constantes cinéticas de primer orden para la inactivación térmica de la enzima Protamex™ en condiciones reactivas y no reactivas

	α -NH (mM)	k_d (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
NR	-	0.0107	65
Sustrato	10	0.0035	201
Sustrato	90	0.0022	312
GH 5%	10	0.0039	179
GH 5%	90	0.0026	270

Resultados similares se han obtenido por Valencia *et al.*, (2014) utilizando la misma metodología de nuestra investigación, donde a 60°C la enzima comercial Alcalase es mucho más estable en presencia de las proteínas del músculo del salmón, incrementando su tiempo de vida media de 37 a 163 y 444 min en presencia de 3.82 mM y 15.2 mM de concentración de sustrato, respectivamente, y en presencia de un hidrolizado con GH del 5%, obtuvo los mismos resultados.

La simulación se muestra en la Figura 29, indica claramente que la inactivación térmica de Protamex™ no puede explicar la forma de la curva de hidrólisis.

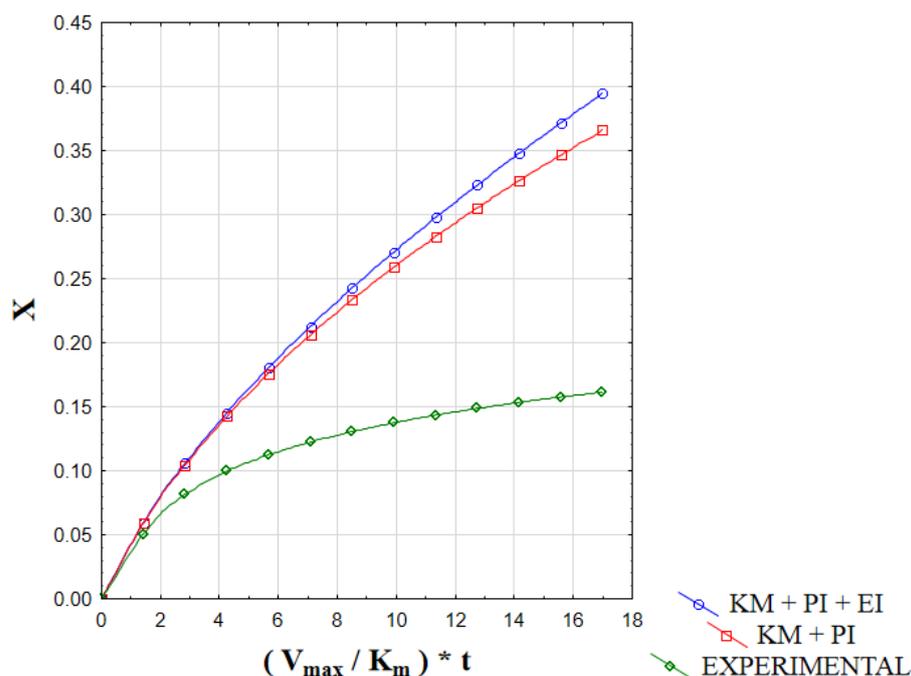


Figura 29: Simulaciones del grado de conversión (X) frente al tiempo adimensional (líneas) para la hidrólisis de proteína de anchoveta entera por la enzima Protamex™ basada en el modelo cinético (KM) en la ecuación 8 y considerando la inhibición por inactivación térmica de la enzima (KM + PI + EI).

Tras formular tres hipótesis para comprender el proceso responsable de la forma típica de la curva de la hidrólisis de proteínas de anchoveta entera: (i) el agotamiento del sustrato, (ii) la inhibición por productos de hidrólisis y (iii) la inactivación térmica de la enzima. Tanto el agotamiento de sustrato y la inactivación térmica de la enzima Protamex™ no simulan la forma de la curva de la hidrólisis en las concentraciones de sustrato iniciales con las que se aplicaron en este estudio. La inhibición por productos de hidrólisis tuvo un efecto significativo en la curva de la hidrólisis y se encontró que era responsable de la forma típica observada durante la hidrólisis enzimática. Estos resultados son muy importantes ya que nos permiten aumentar la eficiencia de este proceso, cada vez que los productos que se van produciendo se retiran del

reactor. Por lo tanto, lo que justifica que al usar un reactor por lotes debe descargarse todo el hidrolizado en un tiempo determinado en donde la hidrólisis no haya alcanzado la fase estacionaria, o en todo caso evaluar la posibilidad de agregar el sustrato o la enzima en diferentes dosis, cada cierto tiempo durante el proceso enzimático, con la finalidad de desestabilizar la ecuación general de cinética enzimática ($E + S \rightleftharpoons [ES] \rightarrow [EP] \rightleftharpoons E + P$) y evitar la inactivación enzimática.

V. CONCLUSIONES

El rango de linealidad para diluciones enzimáticas de 1:2000, 1:3000 y 1:4000 fueron de 10, 15 y 20 minutos, respectivamente. Asimismo la actividad de la enzima comercial Protamex™ fue de $369.435 \pm 19.107 \text{ U} \times \text{mg}^{-1}$.

Los valores de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} de la enzima comercial Protamex™ fueron de $11.217 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ y $0.0116 \text{ g} \times \text{L}^{-1} \times \text{min}^{-1}$, respectivamente.

La hidrólisis proteica por acción de la enzima Protamex™ a diferentes tratamientos produjeron perfiles de péptidos ampliamente similares, entre 9 y 14 KDa, utilizando la técnica de electroforesis SDS-PAGE.

Las condiciones óptimas halladas para el proceso de hidrólisis enzimática, utilizando la metodología de superficie de respuesta fue: relación enzima sustrato de 60 Unidades Anson por cada kg de proteína cruda, factor de dilución de 0.7 kg pescado por cada kg de agua, tiempo de reacción de 90 minutos, en condiciones ambientales constantes de 55°C y pH de 7.5.

La enzima Protamex™ experimentó una cinética con inhibición por producto, expresado por la disminución progresiva de la velocidad de hidrólisis de proteínas de anchoveta entera, conforme a la curva respectiva.

VI. RECOMENDACIONES

Evaluar otros tipos de endoproteasas tales como Corolase 7089, Eeenzy protease, así como exopeptidasas tales como Flavourzyme, Palatase, para la obtención de un mayor rendimiento en el hidrolizado y un mejor sabor en el producto final.

Evaluar otros método para medir el grado de hidrólisis en el proceso de hidrólisis enzimática, tales como: viscosidad, OPA, TNBS, entre otros, para que puedan resultar confiables, repetitivos y de bajo costo.

Estudiar la aplicabilidad de los concentrados proteicos de pescado en algunos productos como conservas de pescado, arroz, sopas deshidratadas, productos de panificación, salsas y bebidas, entre otros, por medio de pruebas de aceptación y análisis descriptivos cualitativos, para evaluar los atributos: color, amargor, aroma de pescado y apariencia.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS Y VIRTUALES

A.O.A.C. (2005). *Official methods of Analysis of A.O.A.C. International: Food Composition, Additives, Natural Contaminants*. Gaithersburg, Maryland. EE.UU.

Abdul-hamid, A., Bakar, J., & Bee, G. H. (2002). Nutritional quality of spray dried protein hydrolysates from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Food Chemistry*, 78, 69–74.

Adler-Nissen J. (1993). Proteases. In: Nagodawithana T, Reed G, Eds. *Enzymes in food processing*. San Diego (USA): Academic Press, p. 159-203.

Adler-Nissen J. y Olsen H.S.(1979). The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. *ACS Symp. Ser.*, 92:125-146.

Adler-Nissen, J. (1977). Enzymatic hydrolysis of food proteins, *Process Biochem.*, 12, 18.

Adler-Nissen, J. (1979) Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27, 1257.

Adler-Nissen, J. (1984). Control of the proteolytic reaction and the level of bitterness in protein hydrolysis processes, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 34B, 215.

Adler-Nissen, J. (1986) *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, New York.

Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers, 427 p.

Ahn, C., Lee, K., & Je, J. (2010). Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from tuna liver: Effects of enzymes and molecular weight on bioactivity. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 562–568.

Aleman, A., Gimenez, B., Montero, P., & Gomez-Guillen, M. C. (2011). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 407–413.

- Andres Illanes, Lorena Wilson, Carlos, Vera. *Problema in Enzyme Biocatalysis*-Wiley (2014), [344 pp.], ISBN: 978-1-118-34171-1
- Apar, D.K., Özbek, B. (2007). Hydrolysis and solubilization of corn gluten by Neutrase. *J Chem Technol Biotechnol* 82: 1107–14.
- Archer, M.C., Ragnarsson, J.O., Tannenbaum, S.R., Wang, D.I.C. (1973). Enzymatic solubilization of an insoluble substrate, fish protein concentrate: process and kinetic considerations. *Biotechnology and Bioengineering* 15, 181–196.
- Aspmo, S. I., Horn, S. J., & Eijsink, V. G. H. (2005). Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*, 40, 1957–1966.
- Baek, H.H., Cadwallader, K.R. (1995). Enzymatic Hydrolysis of Crayfish Processing By-products. *Journal Food Science* 60: 929 – 935.
- 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, 18–24.
- Benítez, R., Ibarz, A., Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquím Clín Latinoam*; 42, 227-36
- Benkajul, S., Morrissey, M.T., 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 3423–3430.
- Bernal, P., F. Robles y O. Rojas. (1983). Variabilidad física y biológica en la región meridional del Sistema de corrientes Chile-Perú. *FAO Fish. Rep.*, 291:683711.
- Bhaskar, N., Benila, T., RaGHa, C., & Lalitha, R. G. (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysates using a commercial protease. *Bioresource Technology*, 99, 335–343.
- Bledsoe, G. E., Bledsoe, C. D., & Rasco, B. (2003). Caviars and fish roe products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 317–356.
- Blenford, D. E. (1994). Protein hydrolysates: functionalities and uses in nutritional products. *Int. Food Ingr.*, 3, 45.

- 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, 559–565.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Ravallec-Ple, R., Leroy, Y., Guillochon, D., Barkia, A., & Nasri, M. (2008). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. *Food Chemistry*, 111, 350–356.
- Camacho, F., Gonzalez-Tello, P., Paez-Duenas, M. P., Guadix, E. M., Guadix, A. (2001). Correlation of base consumption with the degree of hydrolysis in enzymic protein hydrolysis. *Journal of Dairy Research*, 68: 251–265.
- Candido, L. M. B., & Sgarbieri, V. C. (2003). Enzymatic hydrolysis of Nile tilapia (*Oreochromus niloticus*) myofibrillar proteins: Effects on nutritional and hydrophilic properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 937–944.
- Chalamaiah, M., Balaswamy, K., Narsing Rao, G., Prabhakara Rao, PG., & Jyothirmayi, T. (2013). Chemical composition and functional properties of mrigal (*Cirrhinus mrigala*) egg protein concentrates and their application in pasta. *Journal of Food Science and Technology*. *J Food Sci Technol*, 5, 514-20
- Chalamaiah, M., Narsing Rao, G., Rao, D. G., & Jyothirmayi, T. (2010). Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. *Food Chemistry*, 120, 652–657.
- Chalamaiah, M., Dinesh-Kumar B., Hemalatha, R., y Jyothirmayi, T. (2011). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, 135, 3020–3038.
- Cheftel, C., Ahern, M., Wang, D.I.C., Tannenbaum, S.R. (1971). Enzymatic solubilisation of fish protein concentrate: Batch-studies applicable to continuous enzyme recycling process. *J Agric Food Chem* 19: 155–61.
- Chobert, J.M., Bertrand-Harb, C., Nicolas, M.G. (1988). Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36, 883–886.

- Choi, Y. J., Hur, S., Choi, B. D., Konno, K., & Park, J. W. (2009). Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. *Journal of Food Science*, 74, C17–C24.
- Cinq-Mars, C. D., & Li-Chan, E. C. Y. (2007). Optimizing angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate using response surface methodology and ultrafiltration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9380–9388.
- Coolbear, T., Whittaker, J. M., & Daniel, R. M. (1992). The effect of metal-ions on the activity and thermostability of the extracellular proteinase from a thermophilic bacillus, Strain Ea-1. *Biochemical Journal*, 287, 367–374.
- Cupp-Enyard, C. (2008). Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. *J. Vis. Exp.* (19), e899
- Cushing, D.H. (1990). Plankton production and year-class strength in fish populations: an update of the match/mis-match hypothesis. *Adv. Mar Biol.*, 26: 249-294.
- De Oliveiraa, D., Minozsoa, G., Licodiedoffb, S., y Waszczyński, N. (2016). Physicochemical and sensory characterization of refined and deodorized tuna (*Thunnus albacares*) by-product oil obtained by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry* 207, 187–194.
- Demirhan, E., Apar, D.K., Özbek B. (2011). Sesame cake protein hydrolysis by Alcalase: effects of process parameters on hydrolysis, solubilisation and enzyme inactivation. *Korean J Chem Eng* 28, 195–202.
- Diniz, F.M, Martin, A.M. (1997). Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein. Composition of the hydrolysates. *Int J Food Sci Nutr* 48: 191–200.
- Diniz, F.M., Marin, A.M. (1998). Influence of process variables on the hydrolysis of shark muscle protein. *Food Science and Technology International* 4:91-98.
- Douglas, B.C., Moreno, J.M., García, D., Medina, C., Sidorovas, A. (2007). Caracterización de un hidrolizado proteico enzimático obtenido del pez caribe colorado (*pygocentrus cariba humboldt*, 1821). *Interciencia* 32: 188-194.
- FAO. (1985). River fisheries. *Fisheries Technical Paper*. 262. 330.

- Fernández, A., Kelly, P. (2016). pH-stat vs. free-fall pH techniques in the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Food Chemistry* 199: 409 – 415.
- García-Moreno P.G., Guadix, A., Guadix, E.M., y Charlotte, J. (2016). Physical and Oxidative Stability of Fish Oil-In-Water Emulsions Stabilized with Fish Protein Hydrolysates. *Food Chemistry* 203, 124–135.
- Gbogouri, G. A., Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2004). Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproduct hydrolysates. *Journal of Food Science*, 69, 615–622.
- Ghassem, M., Fern, S. S., Said, M., Ali, Z. M., Ibrahim, S., y Babji, A. S. (2011). Kinetic characterization of *Channa striatus* muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 467-475.
- Gimenez, B., Aleman, A., Montero, P., & Gomez-Guillen, M. C. (2009). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114, 976–983.
- Godfrey, T. and Reichelt, J., Eds., *Industrial Enzymology. The Application of Enzymes in Industry*, MacMillan, London, UK, 1983.
- González-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E. Páez, M.P., Guadix, E.M. (1994). Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic Models. *Biotechnology and Bioengineering* 44: 523-528.
- Grimble G.K., Keohane P.P., Higgins B.E., Kaminski M.V. y Silk D.B.A. (1986). Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clinical Sci.* 71:65-69
- Grimble G.K., Keohane P.P., Higgins B.E., Kaminski M.V. y Silk D.B.A. (1986). Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clinical Sci.* 71:65-69
- Guadix, A.; Guadix, E.M.; Páez-Dueñas, M.P.; González-Tello, P. y Camacho, F. (2000). Procesos Tecnológicos y Métodos de Control en la Hidrólisis de Proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41, 79-89.
- Guan, X., Yao, H., Chen, Z., Shan, L., Zhang, M. (2006). Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin. *Food Chemistry* 101, 163–170.

- Guerard, F., Decourcelle, N., Sabourin, C., Floch-Laizet, C., Le Grel, L., Le Floch, P., Gourlay, F., Le Delezir, R., Jaouen, P., y Bourseau, P. (2010). Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: A review. *Journal of Science of Halieutique Aquatique*, 2, 21–27.
- Guerard, F., Dufosse, L., De La Broise, D., Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11: 1051–1059.
- Guerard, F., Guimas, L., Binet, A. (2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J Mol Catalysis B: Enzymatic* 19-20: 489-498.
- Hale, M. B. (1972). Making fish protein concentrate by enzymatic hydrolysis, NOAA Technical Report NMFS SSRF-675, US Department of Commerce, Seattle, WA, pp. 1–31.
- Hale, M.B. (1969). Relative activities of commercial-available enzymes in the hydrolysis of fish protein. *Food Technol* 1969;23:107–10.
- Hathwar, S. C., Bijinu, B., Rai, A. K., & Narayan, B. (2011). Simultaneous recovery of lipids and proteins by enzymatic hydrolysis of fish industry waste using different commercial proteases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164, 115–124.
- Hevia, P., Whitaker, J.R., Olcott, H.S.(1976). Solubilization of a fish protein concentrate with proteolytic enzymes. *J Agric Food Chem* 24: 383–5.
- Holanda, H. D. Hidrólise enzimática do resíduo do camarão sete-barbas (*Xiphopenaeus kroyeri*) e caracterização dos subprodutos. 2004. 137 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- Hsu, K. (2010). Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry*, 122, 42–48.
- Jai Ganesh, R., Nazeer, R. A., & Sampath kumar, N. S. (2011). Purification and identification of antioxidant peptide from Black Pomfret, *Parastromateus niger* (Bloch, 1975) viscera protein hydrolysate. *Food Science and Biotechnology*, 20, 1087–1094.

- Jang, H.L., Liceaga, A.M., y Yoon, K.Y. (2016). Purification, characterisation and stability of an antioxidant peptide derived from sandfish (*Arctoscopus japonicus*) protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods* 20, 433–442.
- Je, J. Y., Lee, K. H., Lee, M. H., & Ahn, C. B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 42, 1266–1272.
- Je, J. Y., Qian, Z., Byun, H., & Kim, S. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42, 840–846.
- Jian-xin, H., & Zheng, Z. (2009). Study on enzymatic hydrolysis of *Gadus morrhua* skin collagen and molecular weight distribution of hydrolysates. *Agricultural Sciences in China*, 8, 723–729.
- Jumardi, R., Khairul Faezah Md, Y., y Norhafizah, A., Siti Mazlina, M. (2014). Characterization of Fish Protein Hydrolysate from *Tilapia (Oreochromis niloticus)* by-Product. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 2, 312 – 319.
- Jung, S., Murphy, P.A., Johnson, L.A., 2005. Physicochemical and functional properties of soy protein substrates modified by low levels of protease hydrolysis. *Journal of Food Science* 70, 180–186.
- Klompong, V., Benjakul, S., Yachai, M., Visessanguan, W., Shahidi, F., & Hayes, K.D. (2009). Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). *Journal of Food Science*, 74, C126–C133.
- Kolpakova¹, V.V., Chumikina, L.V., Vasil'ev, A.V., Arabova, I.I., Topunov, A.F. (2014). Wheat gluten proteolysis by enzyme preparations of directional action. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research* 5: 72 – 86.
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 657–666.
- Lahl, W.J. Braun, S.D. (1994). Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technology* 48, 68–71.

- Langmyhr, E. (1981). Dr. Ing. Thesis, The Norwegian Technical University, Trondheim, Norway.
- Latt, S. A., Holmquist, B., & Vallee, B. L. (1969). Thermolysin: A zinc metalloenzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 37(2), 333–339
- Leaver J. y Thomson G. (1993). Influence of heating and cooling on the trypsinolysis of caseins in bovine milk. *Milchwiss.*, 48:378-382.
- Lemieux L. y Amiot J. (1990). Efficiency of five chromatographic systems for the separation of casein digest. *J. Liq. Chromatogr.*, 13(20):4023-4035.
- Liaset, B., Julshamm, K., Espe, M. (2003). Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex™. *Process Biochemistry* 38: 1747 – 1759.
- Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E., Espe, M. (2002). Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex™ protease. *Process Biochemistry* 37: 1263–1269.
- Liaset. B., Lied, E., Espe, M. (2000). Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. *J Sci Food Agric* 80: 581–9.
- Liceaga-Gesualdo, A. M., & Li-Chan, E.C.Y. (1999). Functional properties of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 64, 1000–1004.
- Lind C.F. y Lee C.R. (1983). Process for the preparation of protein for hydrolysis. *Eur. Pat. Appl.* 0,087,245 (to Stauffer Chemical Company, USA).
- Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M., (1996). Functional properties of veal bone hydrolysates. *Journal of Food Science* 61, 712–720.
- Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M., Sergent, M., and Phan-Thau-Luu, R. (1995). Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis, *J. Food Sci.*, 60, 949.
- Lineweaver, H. and Burk, D. (1934). The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of American Chemical Society*, 56, 658.

- Liu, C., Morioka, K., Itoh, Y., & Obatake, A. (2000). Contribution of lipid oxidation to bitterness and loss of free amino acids in the autolytic extract from fish wastes: Effective utilization of fish wastes. *Fisheries Science*, 66, 343–348.
- Loffler, A. (1986). Proteolytic enzymes: sources and applications. *Food Technol.*, 40, 63.
- Mackie I.M. (1982). Fish protein hydrolysates. *Process Biochem.*, 31: 26-28.
- Mann, K.H. & J.R.N. Lazier. (2006). *Dynamic of marine ecosystems*. Blackwell Publishing, Oxford, 496 pp
- Marchbank, T., Limdi, J. K., Mahmood, A., Elia, G., y Playford, R. J. (2008). Clinical trial: Protective effect of a commercial fish protein hydrolysate against indomethacin (NSAID)-induced small intestinal injury. *Alimentary Pharmacology y Therapeutics*, 28, 799–804.
- Marquez-Moreno, M.C., Fernandez-Cuadrado, V. (1993). Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. *Process Biochem* 28: 481–90.
- Martinez, K.D., Baeza, R.I., Millan, F., Pilosof, A.M.R. (2005). Effect of limited hydrolysis of sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams. *Food Hydrocolloids* 19, 361–369.
- Martins da Silva, V. (2011). *Estudo da hidrólise enzimática, microencapsulação e secagem por spray dryer da carne de mexilhão (tesis de doctorado)*. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Brasil.
- Mohr, V. (1977). Fish protein concentrate production by enzymic hydrolysis. In: Adler-Nissen J, editor. *Biochemical aspects of new protein food*. New York: Pergamon: 53–62.
- Molla, A.E., Hovannisyan, H.G. (2011). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga *Huso huso* using Protamex. *Int Aquat Res* 3: 93-99.
- Montecino, V., P.T. Strub, F. Chavez, A. Thomas, J. Tarazona & T. Baumgartner. (2006). Bio-physical interactions off Western South-America. In: A.R. Robinson & K.H. Brink (eds.). *The global coastal ocean: interdisciplinary regional studies and syntheses*. The Sea, Harvard University Press, Cambridge, 14: 329-390.

- Moreno, M.C.M., Cuadrado, V.F. (1993). Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. *Process Biochemistry* 8: 481-490.
- Nakajima, K., Yoshie-Stark, Y., & Ogushi, M. (2009). Comparison of ACE inhibitory and DPPH radical scavenging activities of fish muscle hydrolysates. *Food Chemistry*, 114, 844–851.
- Naqash, S.Y., y Nazeer, R.A. (2011). Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from pink perch (*Nemipterus japonicus*) muscle. *Journal of Food Science and Technology*, 50, 972-978.
- Nesse, K.O., Nagalakshmi, A.P., Marimuthu, P., y Mamta Singh. (2011). Efficacy of a fish protein hydrolysate in malnourished children. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 26, 360-365.
- Ngo, D., Qian, Z., Ryu, B., Park, J. W., & Kim, S. (2010). In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Functional Foods*, 2, 107–117.
- Nielsen, P. M. (2009) Enzymes in Protein Modification, in *Enzymes in Food Technology*, Second edition (eds R. J. Whitehurst and M. van Oort), Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Nielsen, S., Deshpande, S., Hermodson, M., Scott, M. (1988). Comparative digestibility of legume storage proteins. *Food Chemistry* 36, 896–902
- Nixon, S. & A. Thomas. (2001). On the size of the Peru upwelling ecosystem. *Deep-Sea Res. I*, 48: 2521-2528.
- Novozymes A/S. Protamex™ Product Sheet. 1998, B716d-GB, 1:2.
- Olajuyigbe, F.M., Ajele, J.O. (2008). Some properties of extracellular protease from *Bacillus licheniformis* LBBL-11 isolated from “iru”, a traditionally fermented African locust bean condiment. *African Journal of Biochemistry Research* 10: 206-210.
- Ordoñez, L.R., Hernández, E.M. (2014). Efecto del Proceso de Elaboración de la Conserva "Desmenuzado de Anchoqueta" (*Engraulis Ringens*) sobre los Ácidos Grasos Poliinsaturados Omega 3. *Ciencia e Investigación* 17: 27-32

- Otani H., Dong X.Y. y Hosono A. (1990). Preparation of low-immunogenic peptide fragments from milk casein. *Milchwissenschaft*,45(4):217-220.
- Ovissipour, M., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., & Shahiri, H. (2009a). The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115, 238–242.
- Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., Shabanpour, B. (2009b). Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food Bioprocess Technol*, DOI 10.1007/ s11947-009-0284-x.
- Pacheco-Aguilar, R., Mazorra-Manzano, M. A., & Ramirez-Suarez, J. C. (2008). Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chemistry*, 109, 782–789.
- Parrado J., Millan F, Hernandez-Pinzón I., Bautista J. y Machado A. (1993). Characterization of enzymatic sunflower protein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*,41:1821-1825.
- Pedersen B. (1994). Removing bitterness from protein hydrolysates. *Food Technol* 48:96/8.
- Perea A., Ugalde U., Rodriguez I. y Serra J.L. (1993). Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: Applications in industrial whey bioconversions processes. *Enzyme Microb. Technol.*, 15:418-423. a. protein by Alcalase. *Process Biochemistry* 49 (2014) 258–264.
- Petersen, B. R. (1994). Removing bitterness from protein hydrolysates, *Food Technol.*, 58, 96.
- Raghavan, S., & Kristinsson, H. G. (2008). Antioxidative efficacy of alkali-treated Tilapia protein hydrolysates: A comparative study of five enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1434–1441.
- Rajaram, D., & Nazeer, R. A. (2010). Antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from marine fishes *Lepturacanthus savala* and *Sphyraena barracuda*. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6, 435–444.

- Rebeca, B.D., Peña-Vera, M.T., Díaz-Castañeda, M. (1991). Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; Yield and nutritional value. *J Food Sci* 56: 309–14.
- Reyes-García, M., Gómez-Sánchez, I., Espinoza-Barrientos, C., Bravo-Rebatta, F. Ganoza-Morón, L. (2009). Cuadro Peruana de Composición de Alimentos. 8.^a ed. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.
- Richardson, T. and Hyslop, D. B., Enzymes, in *Food Chemistry*, 2nd ed., Fennema, O. R., Ed., Marcel Dekker Inc., New York, 1984.
- Roslan, J. Kamal, S. M. M., Yunus, K. F. M. and Abdullah, N. 2014. Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia muscle (*Oreochromis niloticus*) using response surface methodology (RSM). *Sains Malaysiana* 43(11): 1715-1723.
- Rupley J.A. (1967). Susceptibility to attack by proteolytic enzymes. *Meth. Enzymol.* 11:905-917.
- Sampath Kumar, N. S., Nazeer, R. A., & Jaiganesh, R. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). *Amino Acids*. *Amino Acids*, 42,1641-9.
- Sarkki M.L. (1979). Food uses of wheat gluten. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 56: 443-446.
- Sathivel, S., Bechtel, P. J., Babbitt, J., Smiley, S., Crapo, C., Reppond, K. D., & Prinyawiwatkul, W. (2003). Biochemical and functional properties of Herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. *Journal of Food Science*, 68, 2196–2200.
- Sathivel, S., Smiley, S., Prinyawiwatkul, W., & Bechtel, P. J. (2005). Functional and nutritional properties of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Science*, 70, 401–406.
- Schagger, H.; Jagow, G. V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, San Diego, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.
- Shikha, O., Alvarez, C., Kumar, P., O'Donnell, C., y Tiwari, B. (2016). Effect of enzymatic hydrolysis on the production of free amino acids from boarfish (*Capros aper*)

using second order polynomial regression models. *Food Science and Technology* 68, 470-476.

Silvestre, M.P.C. (1997) Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chemistry* 60, 263–271.

Skanderby, M. (1994). Protein hydrolysates: their functionality and applications. *Food Technol. Int. Eur.*, 10, 141.

Slizyte, R., Mozuraityte, R., Martinez-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, 668–677.

Smith D.M. y Brekke C.J. (1984). Functional properties of enzymatically modified beef heart protein. *J. Food Sci.* 49:1525-1528.

Song, S., Li, S., Fan, L., Hayat, K., Xiao, Z., Chen, L., Tang, Q. (2016). A novel method for beef bone protein extraction by lipase-pretreatment and its application in the Maillard reaction. *Food Chemistry* 208: 81–88.

Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2007). Biochemical and functional properties of Sardinelle (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*, 45, 187–194.

Spellman, D., McEvoy, E., O’Cuinn, G., FitzGerald, R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and Ph stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13: 447–453.

Steinhardt, H., Beychok, S. (1964). Interaction of protein with hydrogen ions and other small ions and molecules, in *The Proteins*, Vol. 2, Neurath, H., Ed., Academic Press, New York.

Sumaya-martinez, T., Castillo-morales, A., Favela-Torres, E., Huerta-Ochoa, S., & Prado-Barragan, L. A. (2005). Fish protein hydrolysates from gold carp (*Carassius auratus*). I: A study of hydrolysis parameters using response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 98–104.

Svendsen, I. (1976). Chemical modifications of the subtilisin with special reference to the binding of large substrates. A review, *Carlsberg Res. Commun.*, 41, 237.

- Theodore, A. E., & Kristinsson, H. G. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibition of fish protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 2353–2357.
- Trusek-Holownia A. (2008). Production of protein hydrolysates in an enzymatic membrane reactor. *Biochem Eng J* 39: 221–9.
- Valencia, P., Pinto, M., Almonacid, S. (2014). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry* 49: 258–264.
- Wasswa, J., Tang, J., & Gu, X. (2008). Optimization of the production of hydrolysates from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin using Alcalase. *Journal of Food Biochemistry*, 32, 460–473.
- Wasswa, J., Tang, J., Gu, X., & Yuan, X. (2007). Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*, 104, 1698–1704.
- Webster, J. D., Ledward, D. A., and Lawrie, R. A. (1982). Protein hydrolysates from meat industry by-products. *Meat Sci.*, 7, 147.
- Wei, Q., Zhimin, H. (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: mechanism and kinetic model. *Front Chem China* 3: 308–14.
- Whitaker J.R. (1994). *Principles of enzymology for the food sciences*. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker.
- Wu, H., Chen, H., & Shiau, C. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of Mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36, 949–957.
- Xi-Qun, Z., Jun-Tong, W., Xiao-Lan, L., Ying, S., Yong-Jie, Z., Xiao-Jie, W., Yue, L. (2015). Effect of hydrolysis time on the physicochemical and functional properties of corn glutelin by Protamex hydrolysis. *Food Chemistry* 172: 407–415.
- Yang, J., Ho, H., Chu, Y., & Chow, C. (2008). Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food Chemistry*, 110, 128–136.

- Yang, J., Liang, W., Chow, C., & Siebert, K. J. (2009). Process for the production of Tilapia retorted skin gelatin hydrolysates with optimized antioxidative properties. *Process Biochemistry*, 44, 1152–1157.
- Yin, H., Pu, J., Wan, Y., Xiang, B., Bechtel, P. J., & Sathivel, S. (2010). Rheological and functional properties of Catfish skin protein hydrolysates. *Journal of Food Science*, 75, E11-E17.
- Zhang, W., Li, Y., Zhang, J., Huang, G. (2016). Optimization of Hydrolysis Conditions for the Production of Iron-Binding Peptides from Scad (*Decapterus maruadsi*) Processing Byproducts. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 12: 220 – 229.
- Zheng, X.-Q., Liu, X.-L., Wang, X.-J., Lin, J., & Li, D. (2006). Production of hydrolysate with antioxidative activity by enzymatic hydrolysis of extruded corn gluten. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 763–770.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1:

Determinación de la curva de calibrado para L-tirosina

Cuadro 19: Valores de Absorbancia a 660 nm para dilución de tirosina

# Experiencia	Tirosina 1.1 mM, mL	Agua Destilada, mL	Concentración Tirosina, mM	Abs 660 nm
1	0.00	2.00	0.000	0.0000
2	0.05	1.95	0.0282	0.0985
3	0.10	1.90	0.0579	0.1615
4	0.20	1.80	0.1222	0.2820
5	0.30	1.70	0.1941	0.4900
6	0.40	1.60	0.2750	0.6750
7	0.50	1.50	0.3667	0.8035

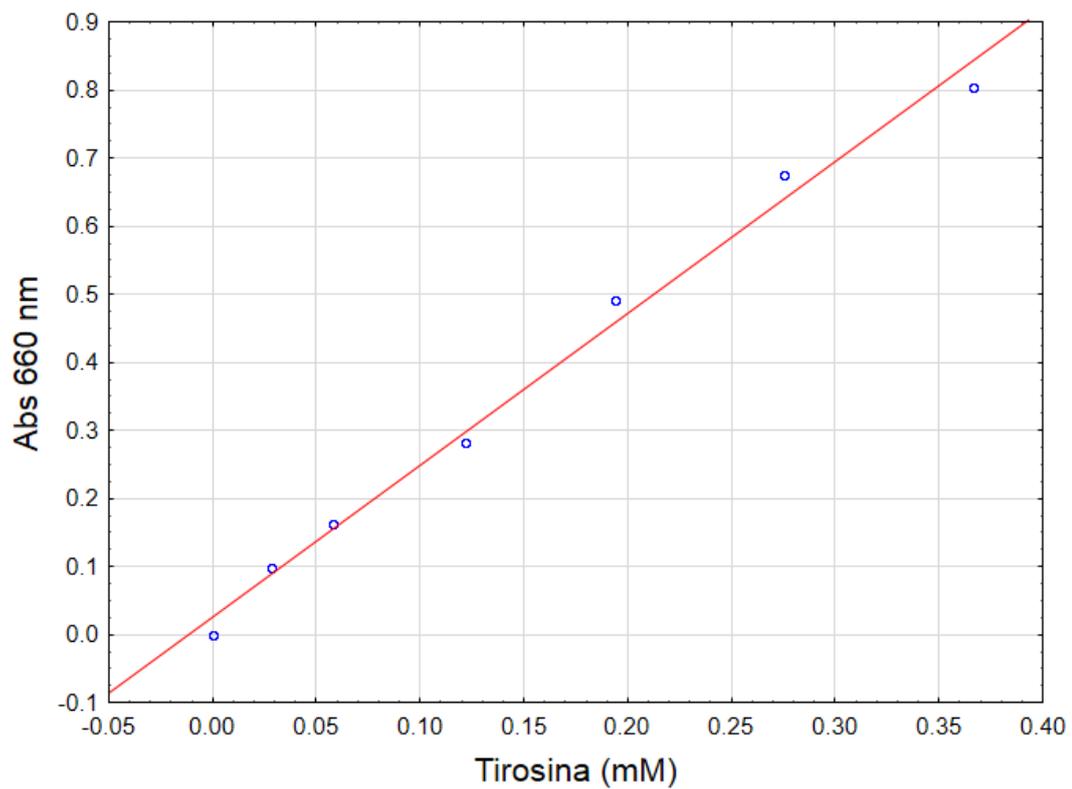


Figura 30: Curva de calibrado para tirosina

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Abs 660 nm} = 0.0263947 + 2.2275 * \text{Concentración Tirosina}$$

ANEXO 2:
Determinación del rango de linealidad para enzima Protamex

Cuadro 20: Concentraciones de tirosina a través del tiempo a diferentes diluciones enzimáticas

Tiempo (min)	Dilución 1:2000		Dilución 1:3000		Dilución 1:4000	
	Abs 660 nm	Concentración tirosina (uM)	Abs 660 nm	Concentración tirosina (uM)	Abs 660 nm	Concentración tirosina (uM)
0	0.0560	13.301	0.1305	46.744	0.0400	6.119
5	0.4350	183.435	0.3945	165.254	0.1965	76.372
10	0.8450	367.484	0.6115	262.666	0.4195	176.477
15	1.0800	472.976	0.8645	376.238	0.6520	280.846
20	1.2520	550.187	1.0545	461.529	0.7860	340.999
25	1.3440	591.486	1.2145	533.353	0.9095	396.438
30	1.4630	644.905	1.2695	558.043	1.0060	439.757

Para obtener la actividad de la enzima en Unidades Sigma / mL.

Insertar el valor de absorbancia corregida en la ecuación de la curva de calibrado y la solución dará lugar a los micromoles de tirosina liberado durante esta reacción proteolítica particular.

$$\frac{U}{mL} = \frac{\mu\text{mol equivalentes de tirosina}}{\text{min}} \times \frac{11}{1 \times 2}$$

Dónde:

11 = Volumen total (en mililitros) del ensayo

1 = Volumen de la enzima (en mililitros)

2 = Volumen (en mililitros) usado en la determinación colorimétrica

Cuadro 21: Determinación de la actividad enzimática para dilución

Dilución Enzimática	Concentración enzimática (mg/mL)	Pendiente (uM Tyr/min)	Unidad Enzimática (U/mL)	Unidad Enzimática (U/mg)
1:2000	0.550	36.73614	202.04877	367.3614
1:3000	0.367	22.85410	125.69755	342.8115
1:4000	0.275	17.57241	96.648255	351.4482

ANEXO 3:
Determinación de los parámetros cinéticos Km y Vmax

Cuadro 22: Determinación de la velocidad inicial de reacción para el sustrato caseína

# Experiencia	Abs 660 nm	Tirosina (mM)	Tirosina (g/L)	V ₀ (g/L*min)
1	0.8885	0.387	0.07012	0.00467
2	0.9785	0.427	0.07744	0.00516
3	1.0350	0.453	0.08204	0.00547
4	1.2245	0.538	0.09745	0.00650
5	1.2405	0.545	0.09875	0.00658
6	1.2690	0.558	0.10107	0.00674

Cuadro 23: Inversa del sustrato vs. Inversa de la velocidad inicial

# Experiencia	V ₀ (g/L*min)	S ₀ (g/L)	1/V ₀ (g/L*min) ⁻¹	1/S ₀ (g/L) ⁻¹
1	0.00467	8.00	213.911	0.125
2	0.00516	9.00	193.691	0.111
3	0.00547	10.00	182.841	0.100
4	0.00650	12.50	153.922	0.080
5	0.00658	15.00	151.894	0.067
6	0.00674	17.50	148.410	0.057

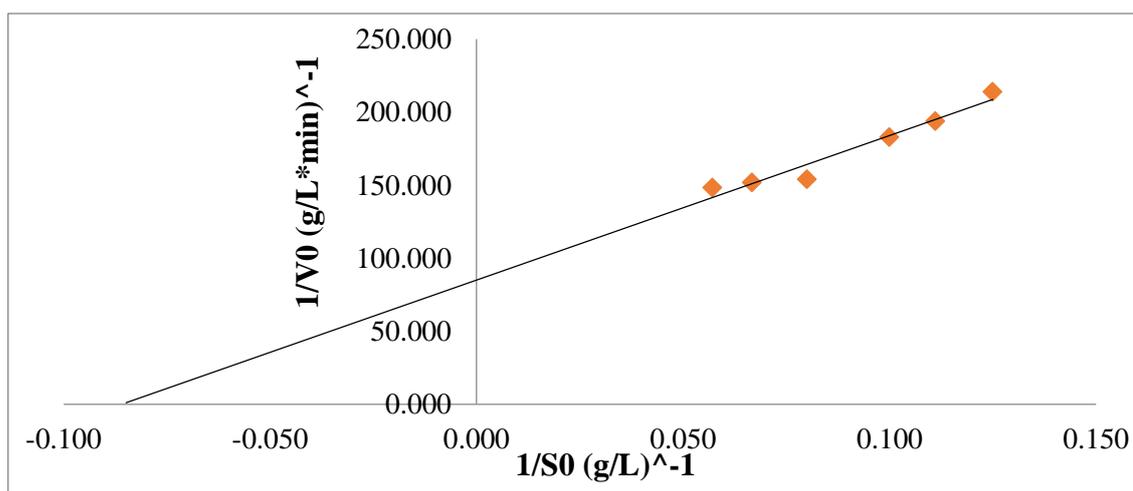


Figura 31: Representación gráfica de Lineweaver-Burk para caseína y Protamex

La ecuación del modelo ajustado es

$$(1/V_0) = 84.9254 + 990.957*(1/S_0)$$

ANEXO 4:
Hidrólisis Enzimática de la anchoveta entera

Cuadro 24: Cantidad de pescado, agua y enzima para cada ensayo de la metodología experimental

Ensayo	Variables independientes					
	Real			Práctico		
	E/S	D	t	Pescado (g)	Agua (g)	Enzima (g)
1	10	0.7	120	308.82	441.18	0.25
2	60	0.7	120	308.82	441.18	1.51
3	10	1.3	120	423.91	326.09	0.35
4	60	1.3	120	423.91	326.09	2.07
5	10	1.0	60	375.00	375.00	0.31
6	60	1.0	60	375.00	375.00	1.83
7	10	1.0	180	375.00	375.00	0.31
8	60	1.0	180	375.00	375.00	1.83
9	35	0.7	60	308.82	441.18	0.88
10	35	1.3	60	423.91	326.09	1.21
11	35	0.7	180	308.82	441.18	0.88
12	35	1.3	180	423.91	326.09	1.21
13	35	1.0	120	375.00	375.00	1.07
14	35	1.0	120	375.00	375.00	1.07
15	35	1.0	120	375.00	375.00	1.07

ANEXO 5:
Grado de hidrólisis en las experiencias del mecanismo de reacción - hipótesis 1

Cuadro 25: Grado de hidrólisis en las experiencias del mecanismo de reacción - hipótesis 1

TIEMPO	10 mM	20 mM	30 mM	40 mM	50 mM	60 mM	70 mM	80 mM	90 mM
0	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%
5	42.768%	26.955%	19.463%	15.100%	12.250%	10.245%	8.761%	7.619%	6.715%
10	68.920%	40.241%	30.949%	23.200%	19.718%	17.271%	14.329%	12.942%	11.844%
15	76.500%	43.641%	34.219%	26.003%	22.487%	20.017%	16.756%	15.358%	14.252%
20	80.933%	45.630%	36.132%	27.736%	24.198%	21.715%	18.325%	16.920%	15.808%
25	84.079%	47.041%	37.489%	28.993%	25.440%	22.946%	19.486%	18.076%	16.960%
30	86.519%	48.135%	38.542%	29.981%	26.416%	23.914%	20.408%	18.994%	17.875%
35	88.512%	49.030%	39.402%	30.794%	27.219%	24.711%	21.173%	19.756%	18.634%
40	90.198%	49.786%	40.129%	31.485%	27.902%	25.388%	21.827%	20.407%	19.283%
45	91.658%	50.441%	40.759%	32.087%	28.496%	25.978%	22.398%	20.975%	19.849%
50	92.946%	51.019%	41.315%	32.619%	29.022%	26.499%	22.904%	21.479%	20.352%
55	94.098%	51.535%	41.812%	33.096%	29.493%	26.966%	23.360%	21.933%	20.803%
60	95.140%	52.003%	42.261%	33.528%	29.921%	27.390%	23.773%	22.344%	21.214%

ANEXO 6:
Grado de hidrólisis en las experiencias del mecanismo de reacción - hipótesis 2

Cuadro 26: Grado de hidrólisis en las experiencias del mecanismo de reacción - hipótesis 2

TIEMPO	10 mM	20 mM	30 mM	40 mM	50 mM	60 mM	70 mM	80 mM	90 mM
0	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%
5	29.133%	18.282%	13.321%	10.477%	8.634%	7.343%	6.387%	5.652%	5.052%
10	58.266%	36.564%	26.642%	20.734%	16.148%	13.420%	10.786%	9.288%	8.148%
15	77.498%	48.115%	35.095%	25.270%	19.315%	16.166%	12.973%	11.269%	9.960%
20	81.932%	51.515%	37.954%	27.515%	21.167%	17.864%	14.438%	12.638%	11.245%
25	84.348%	53.504%	39.722%	29.019%	22.481%	19.095%	15.542%	13.685%	12.242%
30	86.017%	54.915%	41.005%	30.153%	23.500%	20.063%	16.428%	14.534%	13.057%
35	87.294%	56.010%	42.012%	31.062%	24.333%	20.860%	17.168%	15.247%	13.746%
40	88.329%	56.904%	42.842%	31.822%	25.037%	21.537%	17.804%	15.862%	14.342%
45	89.199%	57.660%	43.548%	32.475%	25.647%	22.127%	18.360%	16.403%	14.868%
50	89.949%	58.315%	44.161%	33.046%	26.185%	22.648%	18.856%	16.885%	15.339%
55	90.608%	58.893%	44.704%	33.555%	26.666%	23.115%	19.302%	17.321%	15.765%
60	91.197%	59.410%	45.191%	34.013%	27.102%	23.539%	19.708%	17.718%	16.154%

ANEXO 7:
Grado de hidrólisis en las experiencias del mecanismo de reacción - hipótesis 3

Cuadro 27: Grado de hidrólisis en las experiencias del mecanismo de reacción - hipótesis 3

TIEMPO	10 mM	20 mM	30 mM	40 mM	50 mM	60 mM	70 mM	80 mM	90 mM
0	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%
5	19.086%	12.618%	9.424%	7.520%	6.257%	5.357%	4.683%	4.160%	3.742%
10	38.173%	25.236%	18.848%	15.041%	12.513%	10.653%	9.008%	7.931%	6.772%
15	57.232%	38.195%	25.888%	20.463%	16.218%	13.793%	11.435%	10.108%	8.584%
20	64.081%	43.006%	28.747%	22.955%	18.236%	15.630%	13.004%	11.567%	9.869%
25	67.027%	45.388%	30.515%	24.566%	19.631%	16.933%	14.165%	12.666%	10.866%
30	68.932%	46.984%	31.798%	25.758%	20.698%	17.944%	15.087%	13.547%	11.681%
35	70.341%	48.186%	32.806%	26.705%	21.562%	18.770%	15.852%	14.284%	12.369%
40	71.461%	49.151%	33.635%	27.491%	22.289%	19.468%	16.506%	14.917%	12.966%
45	72.390%	49.957%	34.341%	28.162%	22.916%	20.073%	17.077%	15.471%	13.492%
50	73.184%	50.649%	34.954%	28.748%	23.467%	20.607%	17.584%	15.964%	13.963%
55	73.877%	51.256%	35.497%	29.268%	23.958%	21.084%	18.039%	16.408%	14.389%
60	74.492%	51.795%	35.984%	29.736%	24.402%	21.516%	18.452%	16.813%	14.778%

ANEXO 8:
Grado de conversión a diferentes Si/K utilizando el modelo de inhibición por sustrato

Cuadro 28: Grado de conversión a diferentes Si/K utilizando el modelo de inhibición por sustrato

(Vmax / Km) * t	Si/K = 1	Si/K = 5	Si/K = 10	Si/K = 11.43	Si/K = 11.43 (exp)
0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.978	0.4234	0.1509	0.0769	0.0674	0.0672
1.955	0.7120	0.2988	0.1541	0.1351	0.1184
2.933	0.8739	0.4422	0.2317	0.2033	0.1425
3.910	0.9496	0.5784	0.3095	0.2717	0.1581
4.888	0.9807	0.7035	0.3871	0.3404	0.1696
5.865	0.9928	0.8118	0.4647	0.4093	0.1788
6.843	0.9973	0.8962	0.5416	0.4781	0.1863
7.820	0.9990	0.9515	0.6175	0.5467	0.1928
8.798	0.9996	0.9805	0.6917	0.6147	0.1985
9.775	0.9999	0.9928	0.7631	0.6816	0.2035
10.753	0.9999	0.9975	0.8299	0.7469	0.2080
11.730	1.0000	0.9991	0.8895	0.8093	0.2121

ANEXO 9:

Grado de conversión utilizando el modelo de inhibición por producto

Cuadro 29: Grado de conversión utilizando el modelo de inhibición por producto

(Vmax / Km) * t	KM	KM + PI	EXP
0.000	0.0000	0.0000	0.0000
1.416	0.0546	0.0592	0.0505
2.833	0.1099	0.1045	0.0815
4.249	0.1659	0.1426	0.0996
5.666	0.2224	0.1760	0.1125
7.082	0.2797	0.2060	0.1224
8.499	0.3376	0.2336	0.1306
9.915	0.3962	0.2590	0.1375
11.331	0.4554	0.2829	0.1434
12.748	0.5152	0.3053	0.1487
14.164	0.5755	0.3265	0.1534
15.581	0.6361	0.3467	0.1577
16.997	0.6970	0.3660	0.1615

ANEXO 10:
Grado de conversión utilizando el modelo de inactivación térmica

Cuadro 30: Grado de conversión utilizando el modelo de inactivación térmica

Vmax * t / Km	KM + PI + EI	KM + PI	EXP
0.000	0.0000	0.0000	0.0000
1.416	0.0595	0.0592	0.0505
2.833	0.1058	0.1045	0.0815
4.249	0.1453	0.1426	0.0996
5.666	0.1805	0.1760	0.1125
7.082	0.2127	0.2060	0.1224
8.499	0.2427	0.2336	0.1306
9.915	0.2709	0.2590	0.1375
11.331	0.2976	0.2829	0.1434
12.748	0.3233	0.3053	0.1487
14.164	0.3479	0.3265	0.1534
15.581	0.3718	0.3467	0.1577
16.997	0.3949	0.3660	0.1615

ANEXO 11:
Imágenes del proceso de hidrólisis enzimática

