

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
VALPARAÍSO, CHILE



“EVALUACIÓN DE PROTEASAS COMERCIALES PARA LA
HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS DE ESQUELÓN DE SALMÓN”

MARÍA JOSÉ CAMUS MÁRQUEZ
MEMORIA DE TITULACIÓN PARA OPTAR A TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL QUÍMICO

PROFESOR GUÍA
DR. PEDRO VALENCIA

PROFESOR CO-GUÍA
DR. SERGIO ALMONACID

AGOSTO 2023

RESUMEN EJECUTIVO

Las plantas procesadoras de pescado generan una gran cantidad de subproductos con potenciales aplicaciones alimenticias, y que a menudo son descartados como desecho, entre ellos el esquelón de salmón. En Chile se desechan más de 120.000 toneladas anuales de subproductos en las plantas procesadoras de salmón atlántico, lo cual plantea el desafío de buscar nuevas alternativas y estrategias de valorización de estos residuos. Una alternativa prometedora es utilizar los subproductos como materia prima para la producción enzimática de hidrolizados de proteína de salmón como ingrediente alimenticio de alto valor agregado en el mercado.

El presente trabajo tiene por objetivo evaluar y comparar el desempeño de diferentes proteasas comerciales durante la hidrólisis de proteínas de esquelón de salmón, en concentraciones de proteasa equivalentes, operando en un reactor por lotes al 100% de subproducto, sin control ni ajuste de pH. Las preparaciones de proteasas evaluadas son; i) Alcalase® 2,4L, una endoproteasa alcalina, ii) Protamex®, una mezcla de endoproteasa alcalina y neutra, iii) Neutrase® 0,8L, una endoproteasa neutra, y iv) Flavourzyme® 1000L, una mezcla de ocho endo y exoproteasas. En primer lugar, se determinó el valor de su actividad proteolítica específica en una misma unidad haciendo ensayos de actividad común para las proteasas. Con esto se obtuvieron las tres concentraciones de proteasa a evaluar: 5,2; 10,4 y 20,8 [Us/g esq] (equivalentes a 3,25; 7,5 y 13 [mAU/g esq] de Alcalase 2,4L en unidades Anson), y se calculó la dosis de proteasa (en gramos) correspondiente. Se caracterizó la hidrólisis mediante la determinación de grupos α -amino liberados y obtención de parámetros de un modelo logarítmico. El hidrolizado obtenido luego de una hora de reacción se caracterizó con los parámetros; fracción soluble, grado de hidrólisis y recuperación de nitrógeno. Finalmente se evaluó el costo de las proteasas (por unidad de actividad proteolítica), y se evaluó la relación costo de proteasa - rendimiento de la hidrólisis, calculando el costo en proteasa por masa de nitrógeno recuperado en la hidrólisis.

De los resultados obtenidos se destaca que la hidrólisis con Flavourzyme 1000L presentó mayores valores de concentración de grupos α -amino liberados, susceptibilidad proteolítica, recuperación de nitrógeno y grado de hidrólisis que las otras proteasas. De la evaluación del costo por unidad de actividad proteolítica se obtiene el menor costo con Alcalase 2,4L de 8,1[USD/10⁶Us], seguido por Neutrase 0,8L, Protamex y Flavourzyme 1000L, con costos de 16,8; 24,3 y 40,5 [USD/10⁶Us] respectivamente. En la evaluación costo-rendimiento se obtiene una mejor relación con los experimentos de 5,2[Us/g esq]; Alcalase 2,4L con 8,7 [USD/kg N], seguido por Neutrase 0,8L, Protamex y Flavourzyme 1000L, con 24,0; 26,2 y 36,0 [USD/kg N] respectivamente.

Se concluye que la hidrólisis con 5,2[Us/g esq] de Alcalase 2,4L es la de menor costo en términos de eficiencia y rendimiento. No obstante, la utilización de la proteasa u otra también dependerá de las propiedades funcionales deseadas en el hidrolizado, así los resultados recopilados y las metodologías propuestas en este trabajo serán útiles para el diseño y evaluación económica de futuros proyectos de producción de hidrolizados de esquelón de salmón u otras fuentes de proteína.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN EJECUTIVO	1
ÍNDICE DE CONTENIDOS	2
ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
I. INTRODUCCIÓN	9
II. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo general	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
III. ANTECEDENTES	13
3.1. Industria salmonera	13
3.1.1. Producción mundial de salmón.....	14
3.1.2. Industria salmonera en Chile	15
3.1.3. Residuos en la industria salmonera.....	15
3.1.4. Utilización de los subproductos	16
3.1.5. Marco legal ambiental de los residuos.....	17
3.2. Hidrólisis de proteínas.....	18
3.2.1. Hidrólisis química.....	19
3.2.2. Hidrólisis enzimática	20
3.3. Hidrolizados enzimáticos de proteínas de pescado en alimentos.....	22
3.3.1. Propiedades funcionales: tecnológicas, bioactivas y sensoriales.....	22
3.3.2. Aplicaciones alimenticias de hidrolizados de proteína de pescado	23
3.3.3. Producción de hidrolizados enzimáticos de proteína de pescado	24
3.4. Proteasas para la hidrólisis de proteínas.....	27
3.4.1. Proteasas comerciales evaluadas.....	29
3.5. Análisis y caracterización de la hidrólisis enzimática.....	32
3.5.1. Cuantificación de producto: determinación de grupos α -amino liberados	32
3.5.2. Grado de hidrólisis	35
3.5.3. Recuperación de nitrógeno	35

3.5.4.	Cinética y modelamiento de la hidrólisis enzimática	35
3.5.5.	Determinación de actividad enzimática	38
3.6.	Casos de estudio	41
IV.	METODOLOGÍA	43
4.1.	Materiales	44
4.1.1.	Materia Prima: Esquelón de salmón molido	44
4.1.2.	Equipos	45
4.2.	Ensayos de actividad proteolítica.....	46
4.2.1.	Ensayo con azocaseína.....	46
4.2.2.	Ensayo con esquelón de salmón	47
4.2.3.	Evaluación del costo de las proteasas	50
4.3.	Cálculo de la concentración de proteasa equivalente y dosis.....	50
4.4.	Hidrólisis enzimática al 100% de subproducto	51
4.4.1.	Diseño de experimentos	51
4.4.2.	Procedimiento	52
4.4.3.	Obtención de parámetros de caracterización de la hidrólisis.....	53
4.4.4.	Evaluación del costo de proteasa- rendimiento	59
4.5.	Análisis estadísticos de los resultados.....	59
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
5.1.	Caracterización de las proteasas comerciales.....	60
5.2.	Cálculo de la concentración de proteasa equivalente y dosis.....	65
5.3.	Hidrólisis enzimática al 100% subproducto.....	66
5.3.1.	Curvas de hidrólisis.....	66
5.3.2.	Parámetros del modelo logarítmico	70
5.3.3.	Susceptibilidad proteolítica.....	72
5.1.1.	Fracción soluble	74
5.1.2.	Recuperación de nitrógeno	75
5.1.3.	Grado de hidrólisis	76
5.4.	Evaluación del costo de las proteasas	77
5.5.	Evaluación del costo de proteasa- rendimiento.....	79
VI.	CONCLUSIÓN.....	80

VII. PROYECCIONES	81
VIII. BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXOS	87
Anexo A: Ensayo de actividad proteolítica con azocaseína	87
Anexo B: Diluciones enzimas para ensayos con azocaseína	89
Anexo C: Volumen enzimas para ensayos con esquelón de salmón	89
Anexo D: Procedimiento Hidrólisis Total	90
Anexo E: Procedimiento Método OPA.....	90
Anexo F: Prueba de significancia de parámetros del modelo logarítmico	92
Anexo G: Datos experimentales caracterización del hidrolizado	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Residuos en el procesamiento del pescado y sus valores respecto al peso total (FAO, 2022; Martínez, 2011).....	16
Tabla 2. Comparación de proteasas comerciales para la hidrólisis de proteínas de pescado. Elaboración propia.	31
Tabla 3. Precios de proteasas comerciales a evaluar. Elaboración propia.	32
Tabla 4. Expresiones cinéticas para los parámetros a' y b' del modelo logarítmico correspondientes a la Ec. (3.5.8). Obtenido y adaptado de (Qi & He, 2006).	37
Tabla 5. Composición del esquelón de salmón molido. Elaboración propia.	45
Tabla 6. Listado de equipos utilizados. Elaboración propia.	45
Tabla 7. Diseño de experimentos hidrólisis al 100% subproducto. Elaboración propia.	51
Tabla 8. Parámetros ajustados del modelo logarítmico obtenidos para los ensayos de actividad con esquelón de salmón. Elaboración propia.	62
Tabla 9. Resultados de actividad proteolítica específica de los ensayos con azocaseína y de los ensayos con esquelón de salmón. Elaboración y datos propios.	64
Tabla 10. Concentración de proteasa y dosis a añadir a los experimentos de hidrólisis al 100% de subproducto. Elaboración propia.	66

Tabla 11. Parámetros a [mM /min] y b [mM-1] del modelo logarítmico ajustados a datos experimentales de hidrólisis de esquelón de salmón (al 100%, 60 min a 50°C, pH nativo y sin control). Elaboración propia. 71

Tabla 12. Evaluación del costo en dólares (USD) de las proteasas por unidad de actividad. Elaboración propia. 78

Tabla 13. Equipos para realización de ensayo con azocaseína. Elaboración propia. 87

Tabla 14. Diluciones de enzima utilizadas para los ensayos de actividad con azocaseína..... 89

Tabla 15. Volumen de proteasas utilizadas para los ensayos de actividad con esquelón de salmón. 89

Tabla 16. Valores y resultados de la prueba de significancia de parámetros a y b del modelo logarítmico, ajustados a los datos experimentales de la hidrolisis de esquelón de salmón. Elaboración propia. 92

Tabla 17. Datos experimentales usados para caracterización de los hidrolizados de esquelón de salmón obtenidos a los 60 min de reacción. Condiciones de reacción: 100% esquelón de salmón, 50°C, pH nativo y sin control, concentraciones de enzima de: 1) 5,2; 2) 10,4; y 3) 20,8 [$Us/g\ esq$]. Elaboración propia. 93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso productivo acuicultura del salmón. Fuente: adaptado de (Mowi, 2019) 13

Figura 2. Producción mundial de salmón atlántico. Elaboración propia con datos obtenidos de FAO (FAO, 2022). Se informan los valores promedio dentro de un periodo de 5 años. 14

Figura 3. Exportaciones mundiales de salmón años 2017-2019. Reescrito de informe Globefish (FAO, 2020). 14

Figura 4. Cosecha nacional y valores unitarios del mercado global. Elaboración propia a partir de datos de Sernapesca (volumen) (Sernapesca, 2022). 15

Figura 5. Gráfico de producción y generación de residuos de la industria salmonera en Chile (Sernapesca, 2023). 16

Figura 6. Reacción de ruptura / formación del enlace peptídico en una proteína. Obtenido de Nelson & Cox (2005). 19

Figura 7. Diagrama de la producción de hidrolizados de pescado. Obtenido y traducido de (He, et al., 2013). 25

Figura 8. Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática de la Alcalase 2,4L® manteniendo el pH y temperatura, respectivamente, a condiciones óptimas. Fuente: proveedor novozymes®	29
Figura 9. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de la Neutrase 0,8L®. Obtenido de (Novozymes, 2002)	30
Figura 10. Efecto del pH y la temperatura de reacción sobre la actividad enzimática de la Flavourzyme®. Ensayos realizados por método TNBS, sustrato de proteína de soya (8%), concentración de enzima de 33 LAPU/g proteína, a 50°C para el estudio del efecto de pH, a pH 7,0 para el efecto de la temperatura. Obtenido de (Novozymes, 2002).....	30
Figura 11. Esquema instalación experimental método valoración con pH-stato. Obtenido y traducido de (Kristinsson & Rasco, 2000 a).	34
Figura 12. Reacción método OPA. Obtenido de (Nielsen, et al., 2001).....	34
Figura 13. Gráfico Absorbancia obtenida vs cantidad de enzima usada en ensayo de actividad. Ejemplo ilustrativo de verificación linealidad. Obtenido y traducido de (Földesi, 2019).....	40
Figura 14. Esquema de metodología para la experimentación. En color negro se muestra la experimentación, en verde la caracterización derivada de cada etapa y en naranja los parámetros de caracterización obtenidos. Elaboración propia	43
Figura 15. Fotografía referencial de los esqueletes de salmón enteros (previo a molienda).....	44
Figura 16. Fotografía instalación experimental para el ensayo de actividad con esqueleto de salmón.	49
Figura 17. Distinción fases aceite, soluble e insoluble del hidrolizado de salmón resultante luego de la centrifuga (8000RPM por 10 min), donde f.a. es la fase aceite, f.s. es la fase soluble y f.i. es la fase insoluble.....	54
Figura 18. Curvas de actividad proteolítica obtenidas a partir del ensayo con Azocaseína de: a)Alcalase 2,4L, b)Neutrase 0,8L, c)Flavourzyme 1000L y d) Protamex. Condiciones del ensayo: 10 min incubación a 50°C en sustrato de azocaseína al 1% en solución tampón sodio fosfato (50mM, pH 7,5), cuantificación por espectrofotometría (440nm). Elaboración propia.	60
Figura 19. Curvas de hidrólisis obtenidas de los ensayos de actividad con esqueleto de salmón con distintas proteasas: a)Alcalase 2,4L, b)Neutrase 0,8L, c)Flavourzyme 1000L y d) Protamex. Condiciones del ensayo: 10 min incubación a 50°C en sustrato de esqueleto de salmón molido (1% proteína), pH 7,5, cuantificación por valoración con NaOH 0,05N en pH-stato. En viñeta se muestra punto experimental representativo, en línea continua se muestra el modelo logarítmico ajustado. Elaboración propia.....	61
Figura 20. Curvas de actividad proteolítica de: a)Alcalase 2,4L, b)Neutrase 0,8L, c)Flavourzyme 1000L y d) Protamex obtenidas a partir del ensayo on esqueleto de salmón. Condiciones del ensayo:	

10 min incubación a 50°C en sustrato de esquelón de salmón molido (1% proteína), pH 7,5, cuantificación por valoración con NaOH 0,05N en pH-stato. Elaboración propia. 63

Figura 21. Gráficos de correlación entre ensayos de actividad proteolítica con azocaseína y con esquelón de salmón para las proteasas: a)Alcalase 2,4L, b)Neutrase 0,8L, c)Flavourzyme 1000L y d) Protamex. Condiciones del ensayo con azocaseína: 10 min incubación a 50°C en sustrato de azocaseína al 1% en solución tampón sodio fosfato (50mM, pH 7,5), cuantificación por espectrofotometría (440nm). Condiciones del ensayo con esquelón de salmón: 10 min incubación a 50°C en sustrato de esquelón de salmón molido (1% proteína), pH 7,5, cuantificación por valoración con NaOH 0,05N en pH-stato. Elaboración propia 65

Figura 22. Curvas de hidrólisis de esquelón de salmón molido al 100%, 50°C, pH nativo y sin control a concentraciones de 5,2, 10,4 y 20,8 [Us/g esq] de a) Alcalase 2,4L, b) Protamex, c) Neutrase0,8L y d) Flavourzyme 1000L. En viñeta los datos experimentales con sus barras de error y en líneas continuas se presenta el valor del modelo ajustado. Elaboración propia..... 67

Figura 23. Curvas de hidrólisis de esquelón de salmón al 100%, 50°C, pH nativo y sin control de Alcalase 2,4L Protamex, Neutrase 0,8L y Flavourzyme 1000L a las concentraciones de proteasa: a) 5,2 [Us/g], b) 10,4 [Us/g] y c) 20,8 [Us/g]. d) leyenda. En viñeta los datos experimentales con sus barras de error y en líneas continuas se muestra el modelo ajustado. Elaboración propia. 69

Figura 24. Valor de la velocidad inicial (parámetro a [mM/min]) para la hidrólisis de esquelón de salmón con distintas proteasas comerciales y a tres concentraciones de proteasa; 5,2, 10,4 y 20,8 [Us/g] (100% subproducto, 50°C, pH nativo y sin control). Elaboración propia..... 71

Figura 25. Susceptibilidad proteolítica del esquelón de salmón frente a la hidrólisis con Alcalase 2,4L, Protamex, Neutrase 0,8L, Flavourzyme 1000L. Condiciones de reacción: 100% esquelón de salmón, 50°C, pH nativo y sin control, concentraciones de proteasa de 5,2; 10,4 y 20,8 [Us/g esq]. Elaboración propia. 72

Figura 26. Gráficos de susceptibilidad proteolítica (calculada como razón a/b) versus concentración de proteasa para hidrólisis de esquelón de salmón molido (100% esquelón, 50°C, pH nativo y sin control) con a) Alcalase 2,4L, b) Protamex, c) Neutrase 0,8L y d) Flavourzyme 1000L. En líneas punteadas se muestra relación lineal usada para cálculo de la SPe. Elaboración propia. 73

Figura 27. Fracción soluble másica luego de 60 min de hidrólisis de esquelón de salmón con diferentes proteasas comerciales y concentraciones de proteasa. Condiciones de reacción: 100% esquelón de salmón, 50°C, pH nativo y sin control, concentraciones de proteasa de 5,2; 10,4 y 20,8 [Us/g esq]. Elaboración propia. 74

Figura 28. Recuperación de nitrógeno de la fracción soluble luego de 60 min de hidrólisis de esquelón de salmón con diferentes proteasas comerciales. Condiciones de reacción: 100% esquelón de salmón, 50°C, pH nativo y sin control, concentraciones de proteasa de 5,2; 10,4 y 20,8 [Us/g esq]. Elaboración propia. 75

Figura 29. Grado de hidrólisis obtenido a los 60 min de hidrólisis de esquelón de salmón con diferentes proteasas comerciales. Condiciones de reacción: 100% esquelón de salmón, 50°C, pH

nativo y sin control, concentraciones de proteasa de 5,2; 10,4 y 20,8 [*Us/g esq*]. Elaboración propia. 76

Figura 30. Resultados del costo de proteasa-rendimiento de la hidrólisis de esquelón de salmón con Alcalase 2,4L, Protamex, Neutrase 0,8L y Flavourzyme 1000L en las concentraciones de proteasa de 5,2; 10,4 y 20,8 [*Us/g esq*]. Condiciones de hidrólisis: 100% esquelón de salmón molido, 50°C, pH nativo y sin control, 60 min de reacción. Elaboración propia. 79

Figura 31. Curva de calibración para método OPA. Datos y Elaboración Propios. 91

I. INTRODUCCIÓN

Más del 50% en peso de la producción acuícola del salmón corresponde a subproductos que a menudo son descartados como desechos en las plantas procesadoras (FAO, 2022). Sólo en el año 2022 en Chile se desecharon alrededor de 156 mil toneladas de subproductos exclusivamente en las plantas procesadoras de salmón atlántico (Sernapesca, 2023). Estos subproductos incluyen la cabeza, las vísceras, el esquelón, recortes de músculo, piel y escamas del salmón, los cuales representan una materia prima con un altísimo valor y calidad nutricional, con alto contenido de proteína, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales (Martínez, 2011).

Actualmente la industria del salmón busca reducir los desechos generados para asegurar el uso integral de los recursos y una producción sostenible, lo cual plantea el desafío de buscar nuevas alternativas y estrategias para la valorización de los subproductos (FAO, 2022). Por otro lado, existe un creciente interés de los consumidores por los alimentos funcionales, a los cuales se les añade ingredientes específicos con el fin de aumentar su contenido nutricional y propiedades bioactivas mejorando así la salud y bienestar de las personas que los consumen. La proteína hidrolizada es uno de los ingredientes ampliamente utilizados para esto debido a sus propiedades funcionales y bioactivas, además de la posibilidad de producirla a partir de subproductos de la industria alimenticia. En vista de esto, una buena alternativa de valorización de los subproductos de salmón es utilizarlos como materia prima en la producción hidrolizados proteicos como ingrediente alimenticio funcional de alto valor agregado.

La hidrólisis de proteínas corresponde a la reacción de ruptura de sus enlaces peptídicos generando como productos péptidos de menor tamaño y/o aminoácidos libres. Esta puede realizarse por medio de un proceso químico o enzimático. En la hidrólisis química la reacción es catalizada por un medio básico o ácido (más utilizado). Este proceso requiere del uso de químicos fuertes, altas temperaturas y pH extremos, obteniéndose hidrolizados con disminución significativa del contenido nutricional respecto de la proteína original, y con funcionalidad bastante pobre (principalmente alta solubilidad), por lo cual, suelen utilizarse en productos de bajo valor en el mercado como fertilizantes o alimento para animales de abasto (Kristinsson & Rasco, 2000 a; He, et al., 2013). En cambio, la hidrólisis enzimática es un bioproceso en el cual se usan proteasas como catalizador de la reacción, sin necesidad de usar pH extremos y obteniéndose hidrolizados de gran calidad nutricional, con buena funcionalidad tecnológica, como alta solubilidad, alta retención de agua y aceite, y buen poder emulsificante, además presentan diversas propiedades bioactivas, como antioxidante, antihipertensivo, antiproliferativo (anticancerígeno), inmunomodulador y actividad neuroprotectora (Kristinsson & Rasco, 2000 a; He, et al., 2013; Martínez, 2011).

Sin duda, la producción de hidrolizados enzimáticos representa una buena alternativa para la valorización de los subproductos de pescado en productos de alto valor agregado en el mercado alimenticio y nutracéutico, sin embargo, su aplicación a nivel industrial aun es limitada por los

altos costos de operación asociados al consumo de enzima y al secado del producto final, que corresponden a los costos más relevantes del proceso (Aspevik, et al., 2016; Petrova, et al., 2018). Esto nos lleva a estudiar la estrategia de valorización de los residuos de salmón mediante la hidrólisis enzimática para extraer y producir proteína hidrolizada como ingrediente alimenticio, usando condiciones deseables para la industria en términos de costos, como lo es trabajar al 100% de subproducto (sin adición de agua) y sin control ni ajuste del pH.

Respecto a las enzimas que se utilizan para la hidrólisis de proteínas, llamadas proteasas, existe una gran variedad disponibles comercialmente, de distintos organismos de procedencia, para distintos rangos de pH y temperatura, distintos formatos y precios, que también presentan diferente actividad proteolítica y diferentes especificidades respecto a los enlaces peptídicos que hidrolizan. Por lo tanto, la reacción de hidrólisis puede desarrollarse de distinta forma al cambiar la proteasa utilizada, generando distintos productos y presentando distinto grado inhibición, y como consecuencia, obtenerse hidrolizados con distinto perfil de péptidos y aminoácidos, lo cual afecta directamente en sus funcionalidades y bioactividades (Aspevik, et al., 2016; Kristinsson & Rasco, 2000 b). Una gran limitación de la investigación de los hidrolizados proteicos de pescado es la falta de estudios que comparen el uso de diferentes proteasas en concentraciones de proteasa (actividad proteolítica) equivalentes (Kristinsson & Rasco, 2000 b).

Considerando lo anterior, el presente trabajo se enfoca en evaluar distintas alternativas de proteasas disponibles en el mercado para la hidrólisis de esquelón de salmón y comparar los costos asociados al consumo de proteasa. Para esto se considera, en primer lugar, el diseño y ejecución de una metodología que permita la caracterización de la equivalencia de la actividad proteolítica global de las proteasas en el sustrato específico a hidrolizar. Luego la evaluación del desempeño de las proteasas para la hidrólisis de esquelón de salmón en concentraciones de proteasa equivalentes, por medio de los parámetros; grupos α -amino liberados, parámetros a y b del modelo logarítmico, susceptibilidad proteolítica, fracción soluble, recuperación de nitrógeno y grado de hidrólisis. Finalmente evalúa el costo de las proteasas (por unidad de actividad proteolítica), y del costo de proteasa-rendimiento de la hidrólisis, calculando el costo en proteasa por cantidad de nitrógeno recuperado en la hidrólisis.

Este trabajo se encuentra asociado al Proyecto Anillo ACT192162 “*Engineering, nutritional and organoleptic study in the incorporation of Salmon-frame calcium as nano-bone particles into commercial products: Enhanced functionality of Salmon fillets*”, el cual plantea el aprovechamiento de los esquelones de salmón en la producción de hidrolizado de proteína y nanopartículas de calcio.

También está asociado al Proyecto FONDECYT Regular 1231328 “*Novel operational strategy designed to increase the protein extraction from food byproducts: Sequential batch for the enzymatic hydrolysis of salmon frame proteins*”, el cual busca correlacionar la capacidad de adsorción de diferentes proteasas comerciales (Alcalase, Neutrase, Protamex y Flavourzyme) con el rendimiento de la hidrólisis de esquelón de salmón operando en lotes secuenciales. El presente

trabajo entrega la metodología para caracterizar la equivalencia de la concentración de proteasa, que permite diseñar experimentos comparables entre una proteasa comercial y otra. Además, se espera que los resultados obtenidos en el presente trabajo sirvan para el diseño preliminar de los experimentos del proyecto.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar y comparar el desempeño de cuatro preparaciones comerciales de proteasas durante la hidrólisis de proteínas de esquelón de salmón, operando en un reactor agitado al 100% de subproducto (sin adición de agua) y sin control ni ajuste de pH.

2.2. Objetivos específicos

- Diseñar y ejecutar una metodología para la caracterización de la equivalencia de la actividad proteolítica global de las preparaciones de proteasa. Permitiendo diseñar experimentos comparables entre una proteasa y otra.
- Caracterizar el comportamiento de la hidrólisis enzimática con cada preparado de proteasa mediante determinación de parámetros del modelo logarítmico.
- Caracterizar los hidrolizados obtenidos mediante los parámetros; grado de hidrólisis alcanzado (GH), fracción soluble (FS) y recuperación de nitrógeno a la fase soluble (RN).
- Comparar el costo de las proteasas evaluadas y la relación costo de proteasa - producto obtenido en la hidrólisis, operando con distintas concentraciones de proteasa.

III. ANTECEDENTES

3.1. Industria salmonera

El salmón es un alimento muy popular en el mundo, siendo ampliamente demandado y reconocido por sus cualidades gastronómicas y nutricionales. Es catalogado como un “superalimento” por su alto contenido en proteínas, grasas saludables como el omega 3, vitaminas A, D y B12 y minerales como yodo y selenio. La producción de salmón es considerada más eficiente en recursos que la producción de carne de vacuno, cerdo y pollo. Además, el salmón tiene una huella hídrica y de carbono por kg de carne comestible producida menor que la del vacuno y del cerdo (Mowi, 2019).

La industria salmonera se ha desarrollado enormemente gracias a la acuicultura del salmón, que corresponden a un conjunto de técnicas y actividades que se realizan para la reproducción, cría y engorde de los salmones. Actualmente, la gran mayoría del salmón comercializado es producido por medio de la acuicultura (Mowi, 2019).

El proceso productivo de la acuicultura del salmón se puede resumir en 5 etapas principales que se muestran en la [Figura 1](#). Primero los huevos son fertilizados e incubados en bandejas, luego los peces son criados en tanques de agua dulce y condiciones controladas hasta que alcanzan un peso de 100-150 [g], luego son transferidos a jaulas de agua salada en donde se realiza la engorda hasta que alcanzan un peso de 4-5 [kg] para luego ser cosechados. Finalmente, los salmones son transportados a las plantas procesadoras, donde son sacrificados y eviscerados para su comercialización. La gran mayoría del salmón se comercializa descabezado y eviscerado o en filetes limpios, por lo que las plantas procesadoras juegan un rol importante en el proceso productivo del salmón (Mowi, 2019).

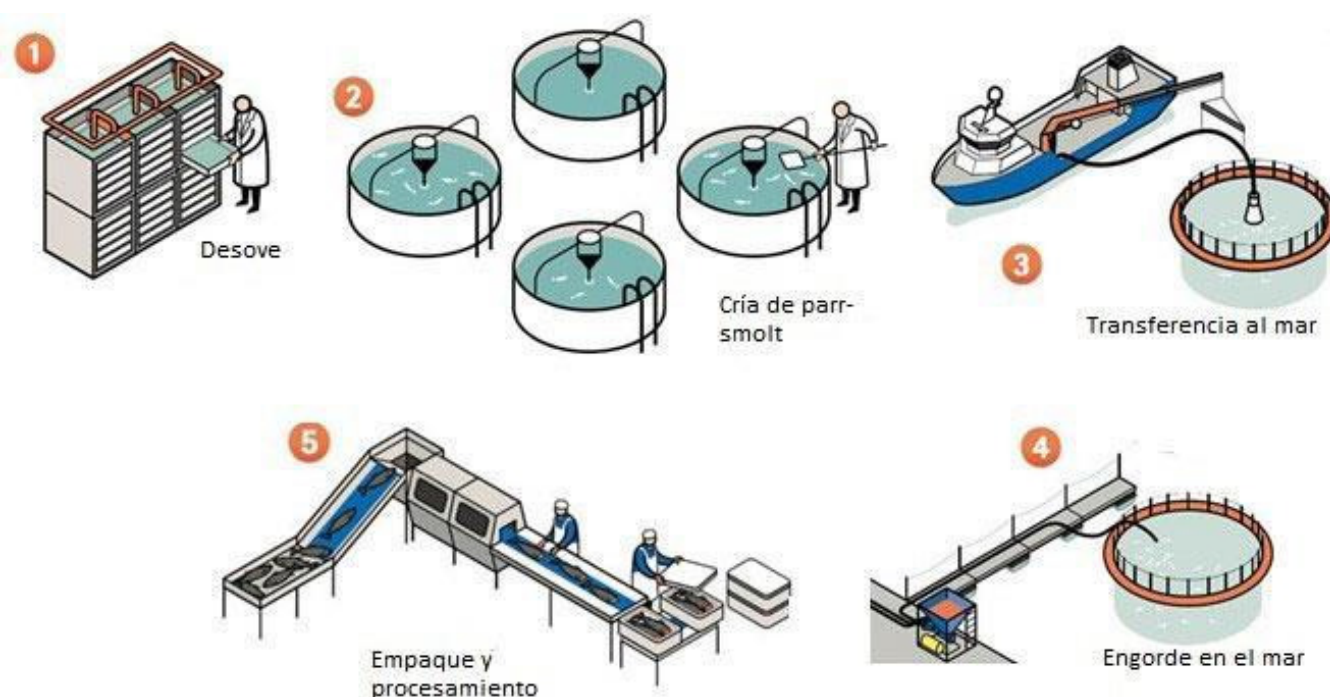


Figura 1. Proceso productivo acuicultura del salmón. Fuente: adaptado de (Mowi, 2019)

3.1.1. Producción mundial de salmón

En el 2020 hubo una producción mundial de salmón atlántico (*Salmo Salar*) por acuicultura de 2.719 miles de toneladas (peso vivo), representando el 32,6% de la producción acuícola marina mundial (FAO, 2022). En la [Figura 2](#) se muestra la producción anual mundial de salmónes por acuicultura, en cual se puede observar un aumento constante de la producción.



Figura 2. Producción mundial de salmón atlántico. Elaboración propia con datos obtenidos de FAO (FAO, 2022). Se informan los valores promedio dentro de un periodo de 5 años.

Los mayores productores de salmón son Noruega y Chile. En el 2019 el 35% del volumen total de las exportaciones de salmón correspondieron a Noruega, el 16% a Chile, mientras que el 12% a Suecia (FAO, 2020). En la [Figura 3](#) se muestra a los mayores productores mundiales y sus volúmenes de exportación.

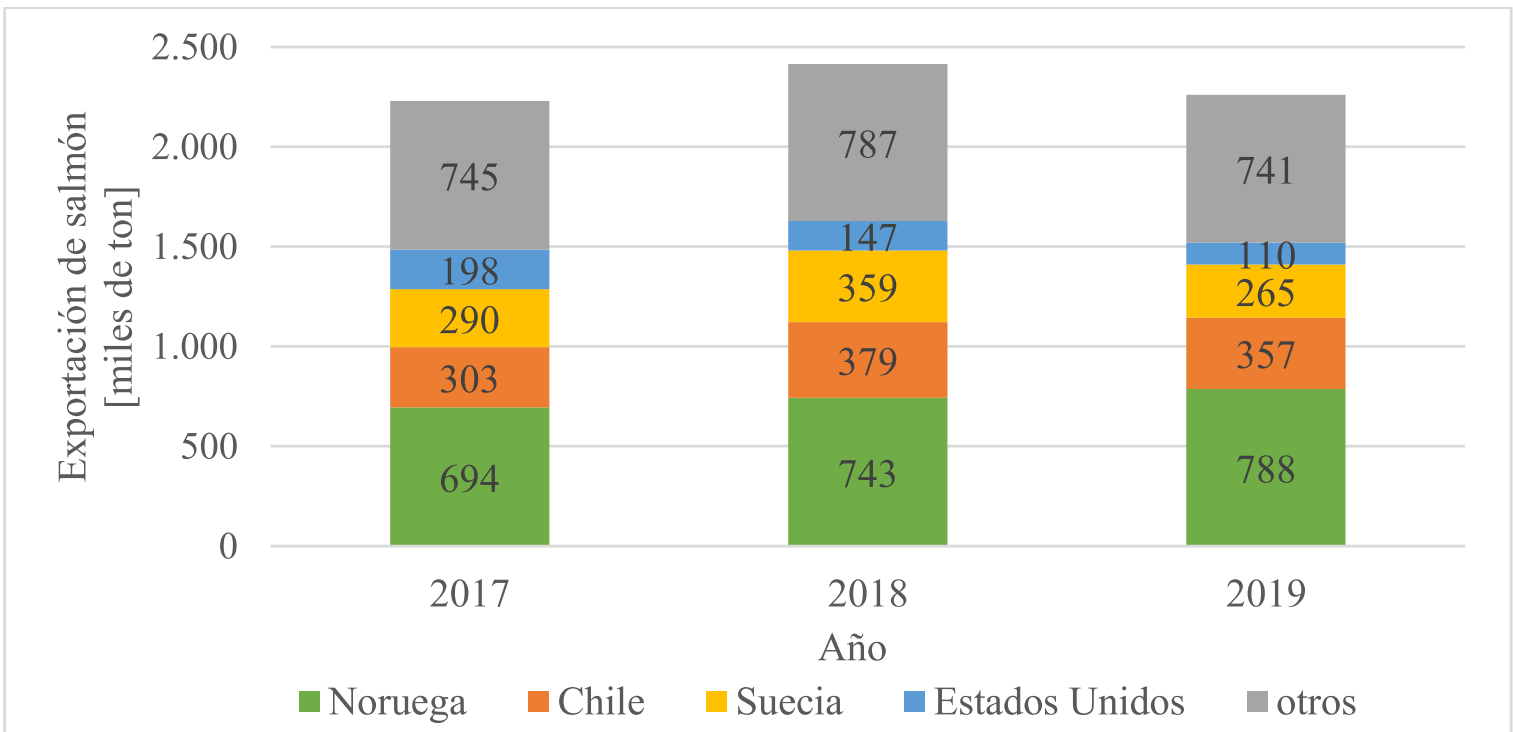


Figura 3. Exportaciones mundiales de salmón años 2017-2019. Reescrito de informe Globefish (FAO, 2020).

3.1.2. *Industria salmonera en Chile*

La acuicultura es una de las principales actividades económicas del país llegando a ser el salmón el segundo producto más exportado del país. Las cosechas de salmónidos han crecido en promedio 10% en los últimos 4 años (Consejo del salmón, 2022).

En Chile la acuicultura está enfocada al cultivo de salmónidos y moluscos, siendo el salmón atlántico la especie más cosechada. En el 2021 las cosechas de salmón atlántico representaron el 51% del total de cosechas de acuicultura nacionales, alcanzando las 725.280 toneladas peso vivo, mientras que el 30% de las cosechas totales correspondió a moluscos y el 19% a salmón plateado y trucha arcoíris (Sernapesca, 2022). Los centros de acuicultura se concentran en las regiones de Los Lagos, Aysén y Magallanes, el 99% de las cosechas del año 2021 son estas regiones, con una participación del 56%, 33% y 10% respectivamente (Sernapesca, 2022). En la [Figura 4](#) se muestra el volumen cosechado de salmón atlántico en Chile, entre los años 2011 y 2021.

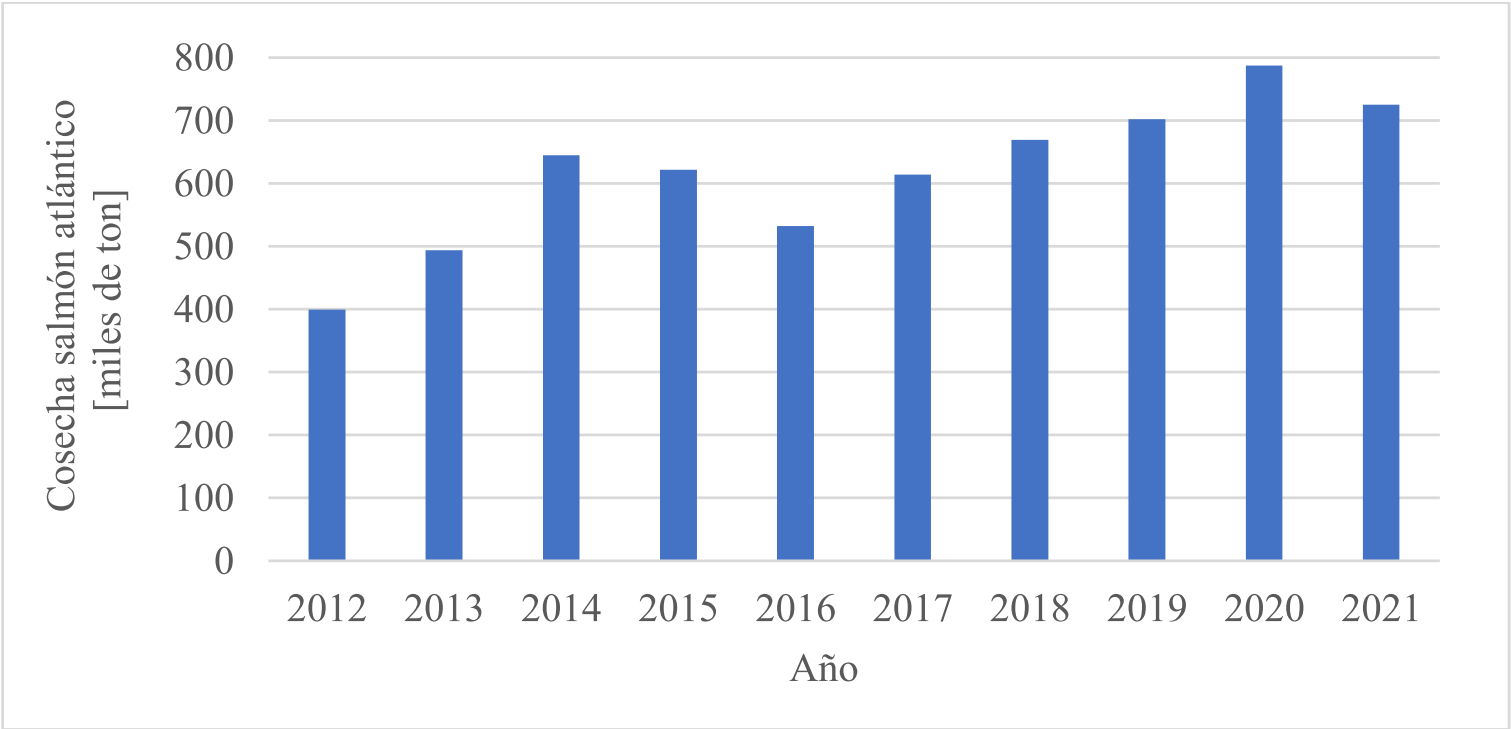


Figura 4. Cosecha nacional y valores unitarios del mercado global. Elaboración propia a partir de datos de Sernapesca (volumen) (Sernapesca, 2022).

3.1.3. *Residuos en la industria salmonera*

El desarrollo y aumento de la producción acuícola del salmón ha conllevado a que el volumen de residuos generados en las plantas procesadoras sea cada vez más alto. Entre el 50 y 70% del peso del pez corresponde a subproductos, dependiendo del tamaño del pez y el formato de producto, y que a menudo son descartados como desecho o bien destinados a la producción de harinas o fertilizantes de bajo valor (FAO, 2022; Kristinsson & Rasco, 2000 a). Estos subproductos incluyen las cabezas, vísceras, huesos, recortes de carne (músculo), piel y escamas, en la [Tabla 1](#) se muestra el porcentaje aproximado del peso del pescado para cada subproducto.

Tabla 1. Residuos en el procesamiento del pescado y sus valores respecto al peso total (FAO, 2022; Martínez, 2011).

Subproducto / residuo	Porcentaje del peso total del pescado [%]
Recortes de músculo	15-20
Cabeza	9-12
Viseras	12-18
Huesos	9-15
Piel	1-3
Escamas	~5

Para dimensionar el volumen de residuos generados por esta industria se han consultado los datos del Sernapesca sobre la cantidad de materia prima ingresada a las líneas de procesamiento de salmón y cantidad de producto elaborado, incluyendo harinas, fertilizantes u otros productos elaborados a partir de subproductos. La diferencia de estos valores corresponde al volumen de subproductos que actualmente no son utilizados en la industria y, por ende, son desechados. En la [Figura 5](#) se muestran los datos recopilados, donde la suma de la producción y residuos corresponde al ingreso de materia prima a la planta. En resumen, se obtiene que en Chile se generan en promedio de 129 mil toneladas anuales de residuos en las plantas procesadoras de salmón atlántico que son actualmente desechados y que, potencialmente, podrían destinarse a la elaboración de productos de alto valor.

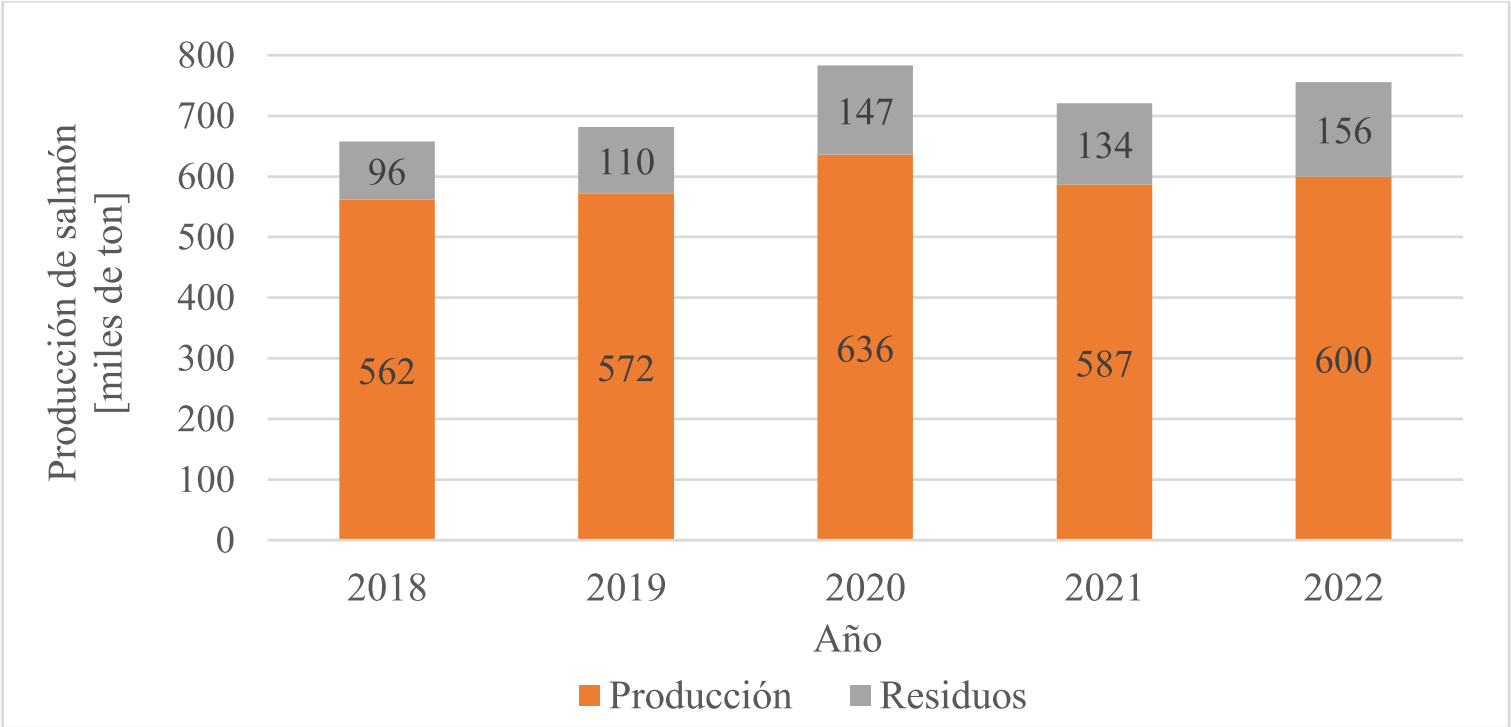


Figura 5. Gráfico de producción y generación de residuos de la industria salmonera en Chile (Sernapesca, 2023).

3.1.4. Utilización de los subproductos

Históricamente en la industria, estos subproductos o residuos son derivados hacia la elaboración de productos con bajo valor en el mercado, como de harinas de pescado y fertilizantes, o bien, son directamente descartados como desecho, lo cual se traduce en pérdidas económicas y diversos problemas ambientales (FAO, 2022). Actualmente la industria busca usar estos residuos para

elaborar productos de alto valor en el mercado y así alcanzar altos niveles de utilización de los subproductos. El desarrollo de nuevos productos e ingredientes a partir de subproductos de pescado se considera una buena alternativa para aumentar el valor añadido a los productos y reducir el impacto ambiental, además de poner en el mercado alimentos funcionales, nutritivos, de bajo costo y con una gran vida útil (FAO, 2022).

Los recortes de músculo, las cabezas, los esquelones (espinazos) y parte de las vísceras como el hígado y las huevas del salmón son buena fuente de proteínas y especialmente de nutrientes como ácidos grasos omega-3 de cadena larga, vitaminas A, D y B12 y minerales como el hierro, zinc, calcio, fósforo y selenio. Estos subproductos se pueden procesar y convertir en productos de consumo humano y altamente nutritivos como salchichas, croquetas de pescado, patés, snack, sopas, salsas entre otros.

Los huesos de pescado son buena fuente de proteínas como colágeno y de minerales como calcio y fósforo, estos se pueden procesar, convertir en harina y utilizarla como complemento alimenticio o bien como ingrediente para fortificar en calcio y proteínas ciertos alimentos como otras harinas, galletas y fideos. Otra alternativa es procesar los huesos y la piel del pescado para producir gelatina y utilizarla como sustituto de la gelatina bobina con aplicaciones en desarrollo de alimentos con películas o recubrimientos comestibles y en la estabilización de emulsiones (FAO, 2022).

Aparte de los múltiples usos en alimentación, estos subproductos de pescado pueden ser utilizados en aplicaciones biotecnológicas y farmacéuticas ya que son una excelente fuente de biocompuestos de alto valor como el colágeno, enzimas, péptidos bioactivos, ácidos grasos de cadena larga (PUFAs) y minerales (Coppola, et al., 2021). El colágeno es reconocido como un biomaterial bastante prometedor en la industria farmacéutica y en aplicaciones biomédicas. Las enzimas presentes en las vísceras del pescado se pueden aislar y utilizar para aplicaciones en cuero, detergentes, alimentos y biorremediación. Las proteínas presentes en todos los subproductos de pescado se pueden hidrolizar o fermentar con microorganismos para convertirlas en péptidos, luego aislarlos y usarlos en aplicaciones de alimentos y farmacéuticas. El aceite de pescado puede ser utilizado para usos industriales, consumo humano, acuicultura y aplicaciones nutraceuticas (Coppola, et al., 2021).

Este tipo de aplicaciones, en las que se pueden convertir residuos en productos de alto valor en el mercado, están ganando cada vez más atención en la industria pesquera y acuicultora, ya que conllevaría el mejor aprovechamiento de los recursos, impulsando el desarrollo sostenible y la construcción de una economía circular (Coppola, et al., 2021).

3.1.5. Marco legal ambiental de los residuos

Los organismos reguladores de la actividad de acuicultura y pesca en Chile son el SERNAPESCA (Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura) y el SUBPESCA (subsecretaría de pesca y acuicultura), los cuales tienen el objetivo de promover la sustentabilidad y conservación de los

recursos hidrobiológicos a través de políticas, normas, gestión sanitaria, medidas de administración y fiscalización integral. En relación con los residuos de pescado de la actividad acuícola, estos organismos establecen condiciones mínimas para el manejo de los subproductos o desechos de pescado generados en las líneas de proceso, como por ejemplo las características de los contenedores, del lugar de acopio y la frecuencia de retiro de los desechos, esto con el objetivo de garantizar la inocuidad del producto en los establecimientos de proceso. Además, los establecimientos que destinen los subproductos a plantas reductoras o transformadoras deben cumplir con condiciones especiales (Sernapesca, 2022).

En el manual de Inocuidad y Certificación del SERNAPESCA se establece que *“Los establecimientos que destinen sus subproductos o desechos, sean cabezas, vísceras, esquelones, piel u otros, a establecimiento reductores, deberán contar con procedimientos que permitan garantizar la correcta identificación y manejo de los materiales de categorías 1, 2 y 3. Así, deberá establecerse, por ejemplo, cómo se realiza la recogida de estos a lo largo de la línea de proceso, de tal manera de asegurar la separación de aquellos subproductos o desechos que entren en contacto directo con el piso o que hayan sido expuestos a otro tipo de fuentes de contaminación. Cabe señalar que los subproductos o desechos que se destinen a la reducción deben cumplir con los requisitos y restricciones aplicables a las materias primas según el mercado al que se busque exportar la harina y/o aceite de pescado resultante”* (Sernapesca, 2022). En dicho manual también se detallan los monitoreos y registros que deben realizarse independientemente de si los desechos son destinados a vertederos o a plantas reductoras.

Actualmente en Chile se están creando nuevas leyes y normativas para fomentar el reciclaje en la industria y para reducir los impactos que tienen en el medio ambiente y avanzar hacia un desarrollo sostenible. Dentro de estas leyes cabe destacar la Ley 21.410 que modifica la Ley general de pesca y acuicultura (LGPA), con el objeto de exigir a los titulares de concesiones de acuicultura medidas para evitar o reducir el depósito de desechos inorgánicos y orgánicos, la cual entra en vigor en enero del 2024 (Ministerio de Economía, Fomento y Turismo, 2022). También se tiene la Ley de Responsabilidad extendida el productor y fomento del reciclaje (Ley REP), la cual busca disminuir la generación de residuos y fomentar su reutilización, reciclaje u otro tipo de valorización haciendo responsables a los productores por los desechos generados en cada una de las etapas de su operación (Ministerio del Medio Ambiente, 2016).

3.2. Hidrólisis de proteínas

Una proteína es una macromolécula, específicamente un hetero-bio-polímero, que está compuesto por aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos entre el grupo α -carboxilo de uno y el grupo α -amino de otro aminoácido.

La hidrólisis de proteínas es la reacción en donde ocurre la ruptura de los enlaces peptídicos de la proteína en presencia de agua, dando como productos péptidos y/o aminoácidos. En la [Figura 6](#) se muestra la reacción de hidrólisis en un enlace peptídico.

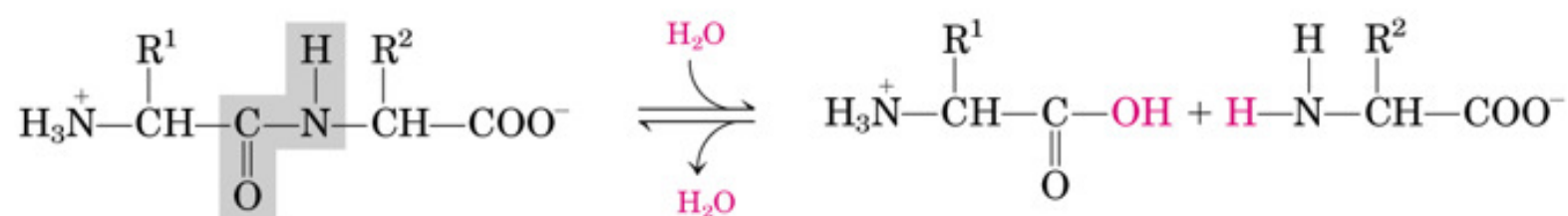


Figura 6. Reacción de ruptura / formación del enlace peptídico en una proteína. Obtenido de Nelson & Cox (2005).

La reacción de hidrólisis de proteínas de por sí es una reacción muy lenta ($k \approx 10^{-3}$ [años⁻¹]) por lo que se utiliza algún tipo de catalizador de la reacción, que puede ser del tipo químico o biológico. A continuación, se comentarán estos dos tipos de hidrólisis y sus aplicaciones haciendo énfasis en el proceso aplicado a proteínas de pescado.

3.2.1. Hidrólisis química

En la hidrólisis química de proteínas el rompimiento de los enlaces peptídicos es catalizado por ocurrir en un medio ácido o básico. Así se diferencia entre la hidrólisis ácida y la hidrólisis alcalina, donde la primera es catalizada por la presencia de H^+ , mientras que la hidrólisis alcalina es catalizada por la presencia de OH^- .

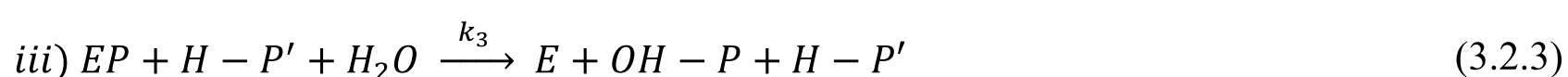
La hidrólisis química de proteínas como proceso industrial es difícil de controlar, requiere del uso de químicos fuertes, condiciones de altas temperaturas y pH extremo, por lo que los productos obtenidos suelen tener composiciones y propiedades funcionales muy variables, además de presentar una disminución significativa de su calidad nutricional con respecto a la proteína original y una funcionalidad bastante pobre (Kristinsson & Rasco, 2000 a). Este tipo de hidrólisis en alimentos generalmente se limita a la producción de potenciadores de sabor a partir de proteínas vegetales, como el glutamato monosódico, aunque cada vez se utiliza menos la hidrólisis química para productos alimenticios.

La hidrólisis ácida se utiliza para lograr una hidrólisis extensiva. En proteínas de pescado es utilizada principalmente para producir fertilizante a bajo costo (Kristinsson & Rasco, 2000 a). La hidrólisis ácida de proteínas de pescado se realiza con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico y a altas temperaturas. En estas condiciones la proteína se hidroliza extensivamente, por lo que la principal propiedad funcional del producto será la alta solubilidad. El producto obtenido debe neutralizarse a un pH ente 6 y 7, luego es concentrado y secado. La hidrólisis total de un sustrato de proteína de pescado se puede alcanzar en 18 horas a 118°C con ácido clorhídrico 6N. Los principales inconvenientes de la hidrólisis ácida es la gran formación de sal (NaCl) en la neutralización y la destrucción del triptófano, aminoácido esencial (Kristinsson & Rasco, 2000 a).

La hidrólisis alcalina se realiza generalmente con hidróxido de sodio y es mucho menos utilizada que la hidrólisis ácida para hidrolizar proteínas, ya que el hidrolizado resultante presenta mala funcionalidad y una disminución de su valor nutritivo. El tratamiento alcalino se usa para hidrólisis parciales, obteniéndose grandes polipéptidos solubles en agua, y no para hidrólisis extensivas o totales ya que se caracteriza por una fase inicial rápida de ruptura de los enlaces peptídicos internos, seguida de una fase bastante lenta. Algunos de los inconvenientes que tiene la hidrólisis alcalina es que ocurren varias reacciones de eliminación y adición que conllevan a productos tóxicos, como por ejemplo la ruptura de los enlaces disulfuro, donde se pierden los aminoácidos cisteína, serina y treonina y se conduce a formaciones de lisinoalanina y ornitinoalanina, que son productos altamente tóxicos e indeseables en alimentos (Kristinsson & Rasco, 2000 a).

3.2.2. *Hidrólisis enzimática*

En la hidrólisis enzimática de proteínas, la ruptura de los enlaces peptídicos es catalizada por un tipo de enzimas llamada proteasas, que actúan disminuyendo la energía de activación de la reacción mediante la formación de un complejo enzima-sustrato. Para describir la reacción se propone un proceso de hidrólisis compuesto por 3 reacciones consecutivas; i) Formación de un complejo enzima-sustrato (3.2.1), ii) Ruptura del enlace peptídico resultando en la liberación de un péptido (3.2.2), iii) Ataque nucleofílico de una molécula de agua sobre el péptido restante, separándose de la enzima (3.2.3). Este proceso puede repetirse sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno solo de ellos (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008). Esto puede representarse como se muestra a continuación, donde E es la enzima, S el sustrato, P y P' son los productos.



La hidrólisis enzimática se puede realizar añadiendo proteasas exógenas o usando las proteasas endógenas contenidas en el sustrato, a esto último se le llama autólisis (Kristinsson & Rasco, 2000 a). A continuación, se describen los distintos tipos de hidrólisis enzimática.

- **Autólisis**

La autólisis o hidrólisis autolítica se realiza con enzimas presentes en el subproducto, pescado en este caso, por lo que no tiene costo asociado a la proteasa. Resulta en un proceso bastante sencillo con condiciones de temperatura y pH no extremos, pero con largos tiempos de reacción que pueden tardar semanas en obtener el producto deseado (Kristinsson & Rasco, 2000 a).

La mayoría de las enzimas endógenas del pescado se encuentran en las vísceras del tracto digestivo, en donde se encuentran proteasas de serina, de tripsina, quimotripsina, proteasa tiol y

pepsina, además en los músculos se encuentran enzimas que contribuyen en menor medida a la hidrólisis de proteínas, como proteasas lisosomales y catepsina. Uno de los mayores inconvenientes de la autólisis es que los tipos y concentraciones de enzimas que se encuentran en los subproductos dependerán de factores biológicos del pez, de condiciones ambientales y estacionales del cultivo y del manejo de los subproductos en el procesamiento. Dada la complejidad de la mezcla de enzimas endógenas que se tienen en los subproductos y su variabilidad, el proceso de autólisis es difícil de controlar en términos de obtención un hidrolizado con propiedades específicas, ya que resulta en un producto con diferentes perfiles moleculares, y con ello a menudo se obtiene una mala funcionalidad.

- **Hidrólisis con adición de enzimas exógenas**

La hidrólisis enzimática de proteínas de pescado con adición de proteasa exógena es un proceso bastante prometedor para la industria en la valorización de residuos de pescado, ya que no se requieren temperaturas ni pH extremos y la hidrólisis es más selectiva, por lo que se pueden obtener péptidos de alta calidad y alto contenido en aminoácidos esenciales (Pasupuleti & Braun, 2010). En este proceso no se producen compuestos tóxicos como en las hidrólisis químicas. Además, la calidad del hidrolizado obtenido es muy superior al obtenido mediante hidrólisis química en cuanto a propiedades funcionales, valor nutricional y propiedades bioactivas (Kristinsson & Rasco, 2000 a).

A diferencia de la autólisis, el proceso de la hidrólisis con adición de enzimas puede ser diseñado y controlado fácilmente para lograr la funcionalidad y propiedades deseadas del producto final. Existe una amplia variedad de proteasas comerciales para este propósito. Se puede seleccionar una proteasa en específico o una mezcla de proteasas según el sustrato que se hidrolizará, el producto que se quiere obtener y las condiciones de pH y temperatura de operación (Kristinsson & Rasco, 2000 a). Además, al conocer las actividades de las enzimas se puede ajustar la adición para lograr la hidrólisis requerida en tiempos mucho menores que en la autólisis. La hidrólisis enzimática puede demorarse desde una a varias horas, dependiendo del grado de hidrolisis deseado, sin embargo, lo común suele ser entre 30 minutos a 2 horas (Petrova, et al., 2018).

La producción de hidrolizados de pescado con adición de enzima ha sido estudiada y demostrada a escala de laboratorio y a pequeña escala comercial, pero no en pleno funcionamiento a escala industrial, debido probablemente a los altos costos de las enzimas (He, et al., 2013). Las principales desventajas que tiene la producción de hidrolizados con adición de enzimas en lotes comerciales son; el alto costo asociado al consumo de proteasa, que las proteasas no pueden ser reutilizadas, que se obtienen bajos rendimientos, y la necesidad de inactivar las enzimas al término de la reacción, lo cual se realiza con tratamiento térmico, de pH o con TCA (ácido tricloroacético) (Kristinsson & Rasco, 2000 a).

No obstante, recientemente distintas empresas han lanzado al mercado productos obtenidos mediante hidrólisis enzimática, empresas como Fiordo Austral y Landes[®] comercializan

hidrolizados enzimáticos de salmón en polvo como ingrediente alimenticio para consumo humano y animal, y otras empresas como Yamamoto® lanzaron al mercado hidrolizados de salmón en forma de suplementos alimenticios de consumo directo (Fiordo Austral, 2021; Landes, 2022; Yamamoto, 2019).

- **Hidrólisis con microorganismos**

En el proceso de hidrólisis con microorganismos o fermentación de proteínas se lleva a cabo la hidrólisis enzimática, pero con las proteasas propias de los microorganismos vivos. En cuanto a la fermentación de proteínas de pescado, se ha reportado la utilización de bacterias proteolíticas *Bacillus Subtilis*, las cuales producen una endoproteasa llamada subtilisina, obteniéndose hidrolizados con actividades antioxidantes y antibacterianas (Nasri, 2017; Jemil, et al., 2014). Una ventaja que tiene la fermentación por sobre la hidrólisis con adición de enzimas es que la producción de la enzima y la hidrólisis de proteínas se realizan simultáneamente en la fermentación y los péptidos producidos se pueden purificar directamente luego de la fermentación. Pero una gran desventaja es el bajo rendimiento del proceso ya que muchos de los péptidos y aminoácidos producidos son utilizados como sustrato por las bacterias para su crecimiento (Nasri, 2017).

3.3. Hidrolizados enzimáticos de proteínas de pescado en alimentos

Los hidrolizados proteicos se definen como proteínas que se encuentran descompuestas en péptidos de distintos tamaños y aminoácidos, ya sean obtenidos por hidrólisis química o enzimática (Skanderby, 1994). Estos se diferencian de sus proteínas de origen en sus propiedades funcionales, nutricionales y biológicas, además del tamaño molecular de sus componentes (Zapata & Gutiérrez, 2017). De ahora en adelante nos referiremos únicamente a los hidrolizados proteicos obtenidos por procesos enzimáticos.

3.3.1. *Propiedades funcionales: tecnológicas, bioactivas y sensoriales*

Las propiedades funcionales se definen como aquellas que afectan el comportamiento de las proteínas en sistemas de alimentos durante su procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo (Kristinsson & Rasco, 2000 a). Las propiedades funcionales pueden clasificarse en 3 tipos; propiedades tecnológicas, que dependen de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos como tamaño, carga o hidrofiliidad (Kristinsson & Rasco, 2000 a); propiedades bioactivas, que son propiedades biológicas que generan una mejora en la salud y bienestar de sus consumidores; y propiedades sensoriales; que constituyen características organolépticas.

Los hidrolizados de pescado presentan diversas propiedades funcionales tecnológicas como alta solubilidad, capacidad emulsionante, capacidad espumante y buena retención de agua y aceites (Kristinsson & Rasco, 2000 a). Estas propiedades resultan ser muy favorables para distintas aplicaciones en la industria alimenticia en comparación con la proteína de pescado sin hidrolizar.

Además, los hidrolizados de proteínas de pescado presentan una alta biodisponibilidad y diversas propiedades bioactivas como antimicrobiana, antihipertensiva, antioxidante, anticoagulante, antiproliferativa (anticancerígena), hipoglicémica, inmunomoduladora y actividad neuro protectora (Urakova, et al., 2012; Kristinsson & Rasco, 2000 a; He, et al., 2013; Harnedy & FitzGerald, 2012).

Las propiedades funcionales que presenten los hidrolizados dependerán de la naturaleza, la composición y el tamaño molecular de los péptidos generados durante la hidrólisis, sin embargo, las propiedades tecnológicas dependen mayormente del tamaño de los péptidos (Chabanon, et al., 2007). Dado que los hidrolizados enzimáticos presentan un perfil peptídico complejo, a menudo se utiliza el largo promedio de cadena peptídica (LCP) para expresar la composición del péptido. La estimación del LCP se calcula como el inverso del grado de hidrólisis (GH), aproximación válida para casi todos los casos prácticos (Kristinsson & Rasco, 2000 a). Es por esto que se puede relacionar las propiedades funcionales tecnológicas con el grado de hidrólisis del hidrolizado, con GH entre 1-10% mejora la solubilidad, la capacidad espumante y emulsificante de los productos alimenticios, por lo cual pueden usarse como ingrediente en formulación de bebidas, galletas, entre otros, con un GH mayor a 10% el hidrolizado contine muy pocos péptidos de gran tamaño entonces presentan una mayor solubilidad y absorción gastrointestinal (biodisponibilidad gastrointestinal), por lo cual pueden usarse para aplicación de alimentos líquidos y dietas especiales (Zapata & Gutiérrez, 2017). En un hidrolizado proteico, obtener un mayor grado de hidrólisis implicará un aumento de la solubilidad y de la capacidad de retención de agua, y una disminución de la capacidad emulsificante, espumante y de retención de aceites (Wasswa, et al., 2007).

Respecto a las propiedades sensoriales de los hidrolizados de pescado existe un inconveniente, que es la generación de amargor. La presencia de amargor en alimentos provoca una sensación desagradable para los consumidores, lo cual desincentiva el uso de los hidrolizados de pescado como ingrediente alimenticio (Kristinsson & Rasco, 2000 a). Es sabido que un factor importante en la generación de amargor son los aminoácidos hidrofóbicos de los péptidos. La hidrólisis de las proteínas provoca la exposición de péptidos hidrofóbicos contenidos en la proteína original, los cuales podrán interactuar más fácilmente con las papilas gustativas resultando en la percepción del gusto amargo. Idealmente se podrían identificar los péptidos responsables de la sensación de amargor y evitar la formación de estos en el proceso de hidrólisis procurando mantener las propiedades funcionales tecnológicas y bioactivas que son deseables en los productos alimenticios (Kristinsson & Rasco, 2000 a).

3.3.2. Aplicaciones alimenticias de hidrolizados de proteína de pescado

Los productos elaborados a base de pescado representan una de las fuentes alimentarias proteicas más completas. Esto sumado a las diversas propiedades funcionales, tecnológicas y bioactivas que presentan los hidrolizados de pescado, ha despertado gran interés en la industria para su utilización

en la elaboración de productos alimenticios de alto valor agregado, como alimentos enriquecidos, alimentos funcionales, nutraceuticos y aplicaciones de conservación de alimentos.

Los hidrolizados de pescado en polvo pueden ser utilizados como péptidos bioactivos para su aplicación en bebidas, panadería y alimentos tradicionales (Zapata & Gutiérrez, 2017). Hidrolizados de esquelones de salmón han sido probados para este propósito en formulaciones de galletas y bizcochos (Singh, et al., 2020). Los hidrolizados de pescado en polvo con alto grado de hidrólisis, que presentan alta solubilidad y gran absorción intestinal, se usan como suplemento alimenticio de consumo directo para ancianos, deportistas, enfermos hepáticos, personas con dietas hipocalóricas y personas con alergias alimentarias (Zapata & Gutiérrez, 2017).

Un ejemplo de uso de los hidrolizados de pescado en el campo de los nutraceuticos es Amizate®, una preparación de hidrolizado enzimático de proteínas de salmón, que ha resultado efectiva para promover la ganancia de peso corporal y aumentar el índice de masa corporal de niños en estado de desnutrición (Nesse, et al., 2014). Otros nutraceuticos que se encuentran en el mercado son Peptide Tea y PeptACE™, ambos formulados con péptidos aislados de pescado Bonito (Nasri, 2017).

Una aplicación en la tecnología de conservación de alimentos que resulta interesante es la adición de hidrolizado de proteína de pescado en filetes frescos para proteger eficazmente la actomiosina durante tratamientos de congelación-descongelación, aumentando la termo-estabilidad del producto y mejorando la textura de éste (Korzeniowska, Cheung, & Li, 2013). Otro uso que se le podría dar a los hidrolizados de pescado es en la conservación de las carnes, ya que se ha probado que la adición de 0,5-3% de hidrolizado de proteína de pescado Capelán, para despostar y picar la carne de cerdo, reduce la formación de productos de oxidación secundaria, incluidas las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (Shahidi, et al., 1995).

3.3.3. Producción de hidrolizados enzimáticos de proteína de pescado

El proceso de producción de hidrolizados enzimáticos a partir de fuentes proteicas animales consta de 3 etapas principales; pretratamiento, hidrólisis, y recuperación. En la [Figura 7](#) se muestra un esquema de la producción de hidrolizados de proteína de pescado a modo de ejemplo.

A continuación, se detalla cada una de las etapas, las alternativas de procesamiento y las consideraciones tecnológicas y económicas.

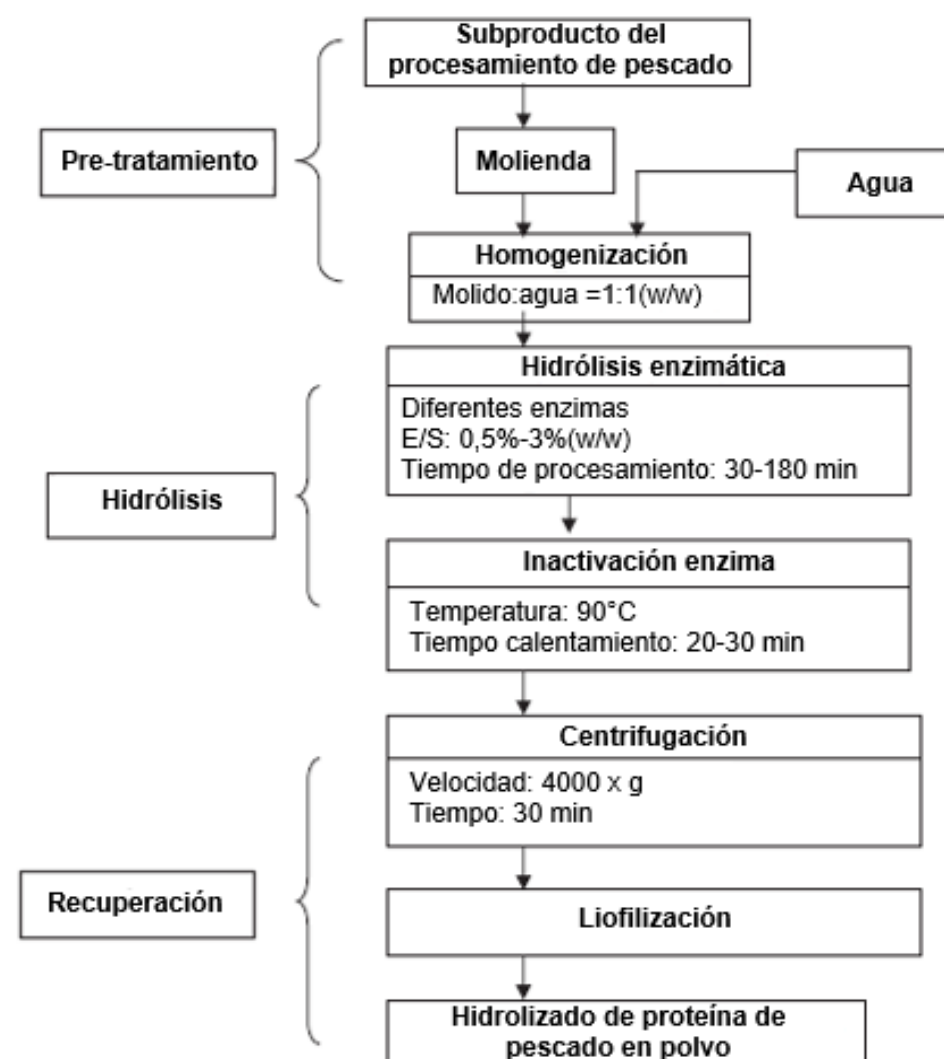


Figura 7. Diagrama de la producción de hidrolizados de pescado. Obtenido y traducido de (He, et al., 2013).

- **Pretratamiento**

El objetivo de esta etapa es preparar una mezcla homogénea de la fuente proteica para la próxima etapa de hidrólisis. En esta etapa la fuente proteica, ya sea pescado u otra, es molida hasta obtener una pasta, y puede o no mezclarse con agua en relación 1:1 (He, et al., 2013). De esta forma se disminuye el tamaño de partícula e incrementa el área superficial del sustrato.

A nivel industrial es conveniente incorporar al pretratamiento un proceso para eliminar el exceso de grasa de la pasta homogénea, ya que un alto contenido en grasa implicará productos oscuros debido a la oxidación lipídica (Kristinsson & Rasco, 2000 a). Además, la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) establece un contenido de grasas en los hidrolizados de pescado para consumo humano por debajo de 0,5% (p/p). Para reducir el contenido de grasas se utiliza adición de agua y tratamiento con etanol u otros solventes aromáticos (90%) (He, et al., 2013). Adicionalmente se puede realizar un tratamiento térmico de pasteurización de la mezcla para reducir la actividad microbiológica y así evitar la descomposición de la materia prima previo a la etapa de hidrólisis (Petrova, et al., 2018).

- **Hidrólisis**

En esta etapa se lleva a cabo la reacción de hidrólisis enzimática, es decir la descomposición de las proteínas en péptidos y aminoácidos. Básicamente se deja reaccionar la mezcla obtenida en el

pretratamiento con la proteasa en condiciones de reacción conocidas, una vez terminada la reacción se inactiva la proteasa contenida en la mezcla con tratamiento térmico o acidificación.

Esta etapa puede llevarse a cabo en reactor discontinuo o en reactor continuo de membrana. El proceso en reactor discontinuo con enzima soluble suele utilizarse en la industria pues es más controlable, sin embargo, presenta la desventaja de tener un costo de operación relativamente alto, ya que no se puede recuperar la enzima utilizada al finalizar la reacción (Nasri, 2017).

La hidrólisis enzimática usando enzimas inmovilizadas, ya sea en reactor continuo o discontinuo, puede ser una alternativa que disminuya los costos de la biocatálisis. Las enzimas inmovilizadas se encuentran ancladas a un soporte por medio de un enlace covalente, mejorando su estabilidad y permitiendo una fácil recuperación de la mezcla de reacción para su reutilización (Nasri, 2017). Otro beneficio que supondría el uso de enzimas inmovilizadas es que se puede prescindir de la etapa de inactivación final, ya que el hidrolizado obtenido no contendría enzima soluble. Se han realizado investigaciones con este tipo de enzimas, sin embargo, aún no se dispone, a nivel comercial, de proteasas inmovilizadas para estos propósitos (Nasri, 2017; Pedroche, et al., 2007).

➤ Condiciones de operación de la hidrólisis

Para realizar la hidrólisis enzimática, inicialmente se debe seleccionar la proteasa a utilizar y determinar las condiciones de operación; concentración de sustrato (S), concentración de enzima (E), temperatura (T) y pH (Kristinsson & Rasco, 2000 a).

La elección de proteasa puede realizarse según distintos criterios que se deben sopesar según la aplicación o uso que se le quiera dar al hidrolizado. Algunos criterios que se utilizan para esto son: la efectividad (medida en unidades de actividad), el costo de la proteasa, la calidad y composición de los productos, entre otros.

La concentración de sustrato (S) o concentración de proteína estará dada por la naturaleza de la fuente proteica que se utiliza y si en el pretratamiento ha sido mezclada con agua.

La concentración de la enzima (E) es un factor importante en cuanto a costos del proceso, ya que las enzimas son relativamente costosas, de hecho, el costo de la proteasa corresponde al mayor costo de operación de la etapa de hidrólisis (Kristinsson & Rasco, 2000 a; Vera, 2016). Mientras mayor sea la concentración de enzima, mayor será la velocidad inicial y menores serán los tiempos de reacción, pero se incrementará el costo de la operación. Por lo que se debe utilizar la concentración de proteasa mínima que satisfaga la tasa de reacción necesaria y el tiempo de reacción esperado.

La temperatura (T) y pH de reacción normalmente son elegidas para optimizar la cinética de la proteasa o mezcla de proteasas seleccionada (Kristinsson & Rasco, 2000 a). Cada proteasa comercial posee un rango de trabajo de temperatura y pH, en el cual su actividad enzimática es máxima. En general el aumento de temperatura, dentro del rango de trabajo de la proteasa, aumenta

la velocidad de reacción (Scopes , 2002). Si la temperatura de reacción está fuera de dicho rango, la proteasa sufre inactivación térmica y disminuye drásticamente su actividad enzimática, así como la velocidad de reacción. A valores de pH fuera del rango de trabajo de la proteasa, la actividad disminuye, y por lo general, a pH extremos se inactivan.

- **Recuperación**

Una vez que se finaliza la reacción es necesario separar la fase acuosa de los sólidos y los aceites contenidos en la mezcla de reacción. Esta separación comúnmente se realiza por medio de centrifugación o filtración de plato y marco, aunque también puede hacerse con membranas de filtración (Petrova, et al., 2018; Kristinsson & Rasco, 2000 a). La fase acuosa recolectada contiene la mezcla de péptidos, aminoácidos y proteínas solubles parcialmente hidrolizadas resultantes de la hidrólisis enzimática. Esta mezcla puede someterse a un proceso de fraccionamiento o separación para aislar péptidos y aminoácidos según su peso molecular, para mejorar las propiedades bioactivas, sensoriales u obtener calidades específicas del hidrolizado (Petrova, et al., 2018). El fraccionamiento de los productos de reacción puede realizarse por medio de membranas de ultrafiltración y nanofiltración, que son utilizadas para separar tamaños de partícula de entre 100-1nm y alrededor de 1nm respectivamente (Petrova, et al., 2018). Generalmente se utiliza ultrafiltración para el fraccionamiento de los productos de hidrólisis y nanofiltración para la concentración de los péptidos y aminoácidos de interés (Saidi, et al., 2014). También existen membranas de materiales específicos que permiten separar los péptidos en función de otras características, como su carga o hidrofobicidad (Abejón, et al., 2018). Para el desarrollo de productos farmacéuticos se requiere un mayor nivel de pureza de los péptidos de interés, para esto se realiza cromatografía de permeación en gel luego de la etapa de filtración por membranas.

Una vez obtenido el hidrolizado deseado en forma acuosa generalmente se deshidrata hasta obtener polvo, con esto aumenta la vida útil del producto y se facilita su conservación y transporte (He, et al., 2013). El producto en polvo puede obtenerse por secado por atomización o liofilización, pero antes de esta etapa es necesario reducir el contenido de agua del hidrolizado acuoso mediante concentración por evaporación. Es importante considerar que cualquier proceso de deshidratación hasta polvo tiene una alta demanda energética, lo que se traduce en altos costos de operación. Estos costos aumentan si aumenta el contenido de agua del hidrolizado, por lo que se debe evitar agregar agua en exceso en etapas anteriores como el pretratamiento. La etapa de secado corresponde a la etapa con mayor demanda energética del proceso de producción de hidrolizados de proteína de pescado (Petrova, et al., 2018; Kristinsson & Rasco, 2000 a).

3.4. Proteasas para la hidrólisis de proteínas

Las enzimas son macromoléculas orgánicas que catalizan una gran cantidad de reacciones químicas, se caracterizan por tener una gran especificidad de sustrato y de reacción que cataliza, esto gracias a la composición y distribución espacial de su sitio activo, que funciona como anclaje

para el sustrato formando el complejo enzima-sustrato. La especificidad de una enzima radica en la composición y distribución espacial precisa de su sitio activo y los grupos radicales de los aminoácidos que se encuentran en él. Estos últimos cumplen el rol de establecer conexiones débiles con los grupos radicales de aminoácidos específicos del sustrato, induciendo la formación del complejo enzima-sustrato (Morcelle, Gomes, & Vairo, 2009).

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de proteínas, son clasificadas dentro de las enzimas hidrolasas de acción sobre el enlace peptídico (E.C.3.4). Estas son ampliamente utilizadas en la industria alimenticia, existe una gran variedad de preparaciones comerciales de proteasas de distinto origen, distinta actividad enzimática y distintas especificidades (Kristinsson & Rasco, 2000 a). Las proteasas son altamente específicas respecto al enlace peptídico que rompen dentro de la proteína. Se clasifican en dos grandes grupos, las endoproteasas y las exoproteasas. Las endoproteasas actúan sobre los enlaces peptídicos interiores de la proteína, como lo son las serina endoproteasas (EC.3.4.21) y las metalo endoproteasas (E.C. 3.4.24). Las exopeptidasas actúan sobre los enlaces peptídicos de los extremos de las proteínas ya sea por los extremos amino (aminopeptidasas E.C.3.4.11) o por los extremos carboxilo (carboxipeptidasas EC. 3.4.16, 3.4.17 y 3.4.18). La especificidad de la proteasa afectará el tamaño y composición molecular y la hidrofobicidad de los péptidos resultantes, lo cual influye directamente en la funcionalidad del hidrolizado (Kristinsson & Rasco, 2000 a). En la industria alimenticia comúnmente se utilizan endoproteasas para la hidrólisis de proteínas, sin embargo, también se utilizan exopeptidasas en conjunto con endoproteasas o como hidrólisis posterior para lograr una mayor degradación de la proteína y mejorar propiedades funcionales o sensoriales del producto.

Es muy importante seleccionar la proteasa adecuada para el proceso o experimento, sobre todo si se espera obtener un producto con propiedades funcionales y/o bioactivas específicas, ya que la funcionalidad del hidrolizado está vinculada con las especificidades y las distintas actividades que exhiba el preparado comercial de proteasa utilizado (Kristinsson & Rasco, 2000 b). Resulta útil realizar pruebas de hidrólisis preliminares con la fuente proteica que se desee hidrolizar para encontrar la enzima adecuada (Kristinsson & Rasco, 2000 a).

Como se comentó anteriormente, uno de los criterios de elección de proteasas más importantes es la eficiencia, la cual se mide como actividad enzimática. La actividad enzimática se mide con ensayos de actividad que pueden realizarse con sustratos sintéticos o proteínas nativas (Akpınar & Penner , 2002). La definición de actividad dependerá de la unidad que se utilice, la unidad más utilizada es U (unidad internacional de actividad enzimática), que corresponde a la cantidad de enzima necesaria para lograr la conversión de 1 μmol de sustrato por minuto, en condiciones de reacción conocidas. Las condiciones de reacción se definen para cada ensayo, por lo cual, para declarar una actividad enzimática se debe especificar el ensayo con el cual se obtuvo, el sustrato utilizado, las condiciones de reacción y la definición de la unidad utilizada.

3.4.1. Proteasas comerciales evaluadas

Existe una gran variedad de preparaciones de proteasas en el mercado que se han utilizado exitosamente para la hidrólisis de proteínas de pescado. A continuación, se presentan las características de preparaciones de proteasas que fueron evaluadas en el presente trabajo. Las proteasas que se presentan a continuación son unas de las más utilizadas para la hidrólisis de proteínas de pescado, tanto por autores de investigaciones como en la industria de alimentos.

- **Alcalase®**

Preparación enzimática de origen bacteriano a base de proteasa subtilisina clasificada como EC 3.4.21.62. El organismo de procedencia es *Bacillus licheniformis* (cepa seleccionada). La subtilisina es una serina endoproteasa alcalina, es decir que hidroliza los enlaces peptídicos internos de la proteína y en su sitio activo se encuentra un aminoácido serina que resulta fundamental para la formación enzima-sustrato.

El fabricante es Novozymes® y la comercializa en formato líquido y granulado, de actividades específicas declaradas de 2,4 y 4,0 AU-A/g (Anson Units), también dispone de su versión de grado alimenticio. Las condiciones de trabajo de la Alcalase son; pH entre 6,5-10 y temperatura entre 55-75 °C (Novozymes, 2021). La inactivación térmica de esta proteasa se logra a 85°C por 15 min. En la **Figura 8** se presentan gráficos que muestran el efecto de cambio de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática de la Alcalase. Estos datos son referenciales ya que el efecto de la temperatura y pH varían con los distintos sustratos y condiciones de reacción.

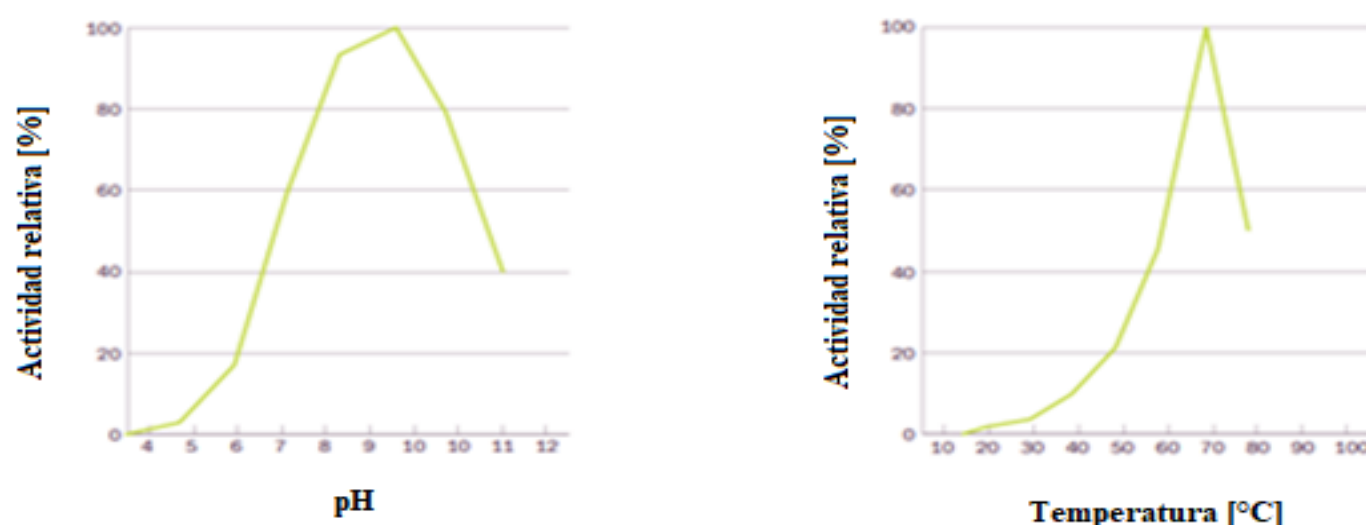


Figura 8. Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad enzimática de la Alcalase 2,4L® manteniendo el pH y temperatura, respectivamente, a condiciones óptimas. Fuente: proveedor novozymes®

- **Neutrase®**

Es una preparación de proteasa neutra de amplio espectro llamada bacilolisina y clasificada dentro de las metalo endoproteasas como EC. 3.4.24.28, la cual es producida por fermentación de una cepa seleccionada de *Bacillus amyloliquefaciens* (Novozymes, 2002). La bacilolisina tiene un cofactor metálico de zinc en su sitio activo, por lo que se estabiliza con Ca^{+2} e inhibe con EDTA.

El fabricante, Novozymes®, la comercializa en formato líquido y granulado y actividades específicas declaradas de 0,8 y 1.5 AU-N/g (Anson Units), también dispone de su versión de grado alimenticio. Las condiciones óptimas de trabajo de la Neutrase son; pH entre 5,5-7,5 y temperatura entre 45-55 °C (Novozymes, 2002). La inactivación térmica de esta proteasa se logra a 85°C por 2 min (Novozymes, 2002). En la **Figura 9** se muestran gráficos referenciales sobre el efecto de cambio del pH sobre la actividad enzimática de la Neutrase 0,8L a 45°C y el efecto de la temperatura a pH 6.

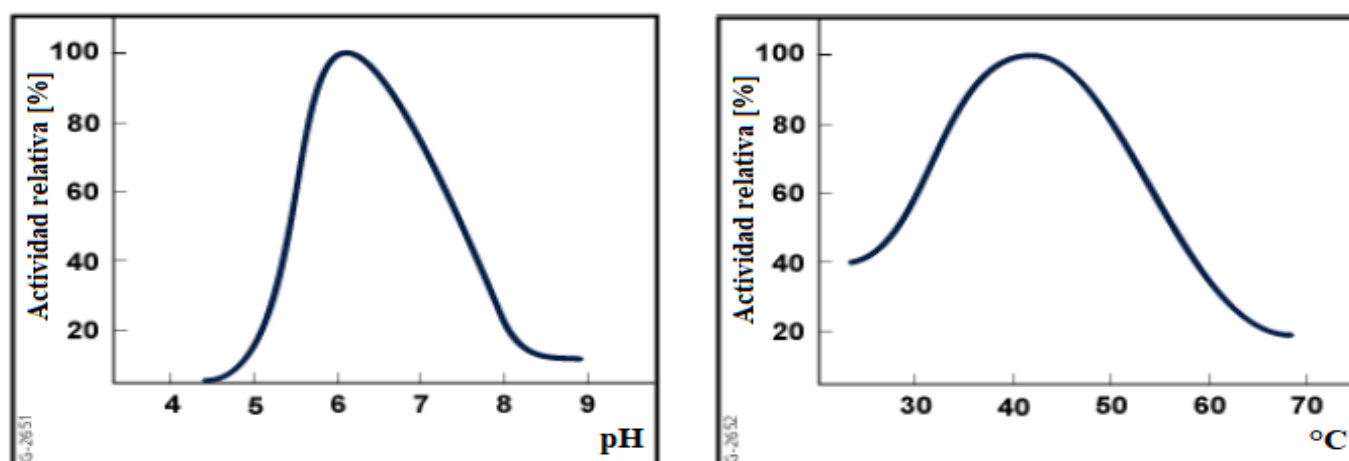


Figura 9. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de la Neutrase 0,8L®. Obtenido de (Novozymes, 2002)

- **Flavourzyme®**

Es un complejo de proteasa de origen fúngico de amplio espectro producida por la fermentación de una cepa seleccionada de *Aspergillus oryzae*. Este complejo presenta actividades de endoproteasa y exoproteasa ya que está compuesto por muchas proteasas. Se han identificado actividades de ocho proteasas distintas; leucina aminopeptidasas A y 2 (EC 3.4.11), dipeptidil peptidasas 4 y 5 (EC. 3.4.14), dos endoproteasas neutrales (EC 3.4.24), una endoproteasa alcalina (EC 3.4.21.63) y una alfa amilasa (EC 3.2.1.1) (Merz, et al., 2015).

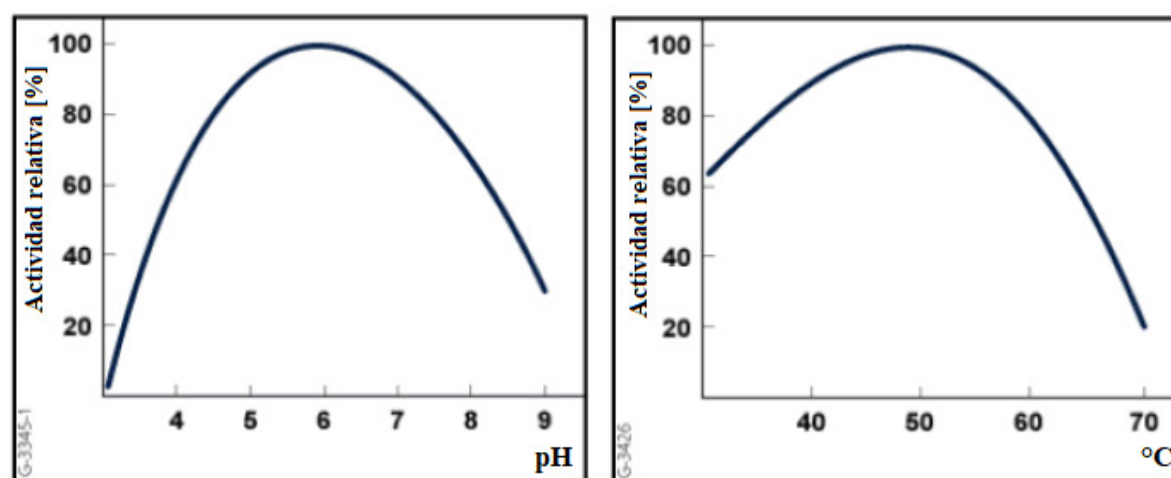


Figura 10. Efecto del pH y la temperatura de reacción sobre la actividad enzimática de la Flavourzyme®. Ensayos realizados por método TNBS, sustrato de proteína de soya (8%), concentración de enzima de 33 LAPU/g proteína, a 50°C para el estudio del efecto de pH, a pH 7,0 para el efecto de la temperatura. Obtenido de (Novozymes, 2002)

El fabricante, Novozymes®, la comercializa en formato líquido y granulado y actividades específicas declaradas de 500 y 1000 LAPU/g (Leucine AminoPeptidase Units), también dispone de su versión de grado alimenticio. El rango de pH de trabajo es 5,0-7,0 y el pH óptimo respecto

a la actividad exopeptidasa es 7,0. El rango de temperatura de trabajo de 30-65°C y su óptimo es alrededor de 50°C (Novozymes, 2002). La inactivación térmica de Flavourzyme se logra manteniendo a 75°C por 10 min (Novozymes, 2002). En la [Figura 10](#) se muestran gráficos de referencia que muestran el efecto de cambio del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática de la Flavourzyme

- **Protamex®**

Protamex® es un complejo de endoproteasas de amplio espectro de origen bacteriano compuesta por las proteasas subtilisina y bacilolisina, las que corresponden a la clasificación de serina endoproteasa EC 3.4.21.62 y metalo endoproteasa (Zn) EC. 3.4.24.28 respectivamente. La subtilisina es producida la fermentación de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformis* y la bacilolisina por la fermentación de una cepa seleccionada de *Bacillus amyloliquefaciens* (Liaset, et al., 2002).

El fabricante, Novozymes®, la comercializa en formato granulado y actividad específica declarada de 1,5 AU-A/g (Anson Units). Protamex cumple los requerimientos de pureza para considerarse de grado alimenticio. Las condiciones de trabajo pH de 6,0-9,0 y la temperatura entre 30-65°C (Novozymes, 2022). La inactivación térmica de Protamex se logra manteniendo a 85°C por 10 min (Liaset, et al., 2002).

En la [Tabla 2](#) se presenta un resumen de las características de las preparaciones de proteasas evaluadas.

Tabla 2. Comparación de proteasas comerciales para la hidrólisis de proteínas de pescado. Elaboración propia.

Proteasa	Formato disponible	Actividades específicas declaradas	Tipo de enzima	Organismo procedencia	EC no. Enzima	pH trabajo	T° trabajo [°C]
Alcalase ®	Granulado, líquido	2,4 4,0 AU-A/g ¹	Serine Endo- proteasa	<i>B. Licheniformis</i>	3.4.21.62 Subtilisina	6,5- 10	60-75
Neutrase ®	Granulado, Líquido	0,8 1,5 AU-N/g ²	Metalo Endo- proteasa	<i>B. Amyloliquefaciens</i>	3.4.24.28 Bacilolisina	6 – 9	30-65
Flavourzyme ®	Granulado, Líquido	500 1000 LAPU/g ³	Mezcla endo y exo-proteasas	<i>Aspergillus Oryzae (fungi)</i>	Complejo 8 proteasas	4 - 8	30-65
Protamex ®	Granulado	1,5 AU-A/g ¹	Endo-proteasa amplio espectro	<i>B. Licheniformis</i> y <i>B. Amyloliquefaciens</i>	3.4.21.62/ 3.4.24.28 Subtilisina / Bacilolisina	6 – 9	30-65

¹: Unidad definida como la cantidad de enzima que liberará 1,0 µmol de L-tirosina de la hemoglobina por minuto a 25°C, pH 7,5. ²: Para ensayo de actividad de Neutrase se usa buffer Ca⁺² al 0,02M. ³: Unidad definida como cantidad de enzima que hidrolizará 1 µmol de L-leucina-p-nitroanilida por minuto. Sustrato 26 mM de L-leucina-p-nitroanilida, 0,1 M Tris buffer (pH 8,0), 40°C.

El consumo de proteasa constituye el costo de operación más importante de la etapa de hidrólisis en la producción de hidrolizados proteicos, correspondiendo a alrededor del 90% de los costos de operación de dicha etapa (Vera, 2016). Por lo que es de vital importancia seleccionar la proteasa adecuada, desde el punto de vista económico y funcional. En la presente investigación se realizó una evaluación de distintas proteasas comerciales que se espera que sirva como antecedente para la elección de proteasa en la producción de hidrolizados de salmón, otorgando un punto de comparación respecto al costo-beneficio de cada una de ellas. Para esto se ha realizado una cotización de las proteasas que serán evaluadas en el presente trabajo (Tabla 3). Estas son: Alcalase 2,4L, formato líquido con actividad específica declarada de 2,4AU-A/g, Neutrase 0,8L, formato líquido de actividad específica declarada 0,8AU-N/g, Flavourzyme 1000L, formato líquido de actividad específica declarada de 1000 LAPU/g, y Protamex, formato granulado de actividad específica declarada de 1,5 AU-A/g. Cabe mencionar que la cotización se realizó con el proveedor Girona S.A. (Santiago, Chile) quienes comercializan las proteasas de Novozymes a nivel industrial.

Tabla 3. Precios de proteasas comerciales a evaluar. Elaboración propia.

Proteasa	Precio [USD/kg] ¹	Fecha cotización Día-mes-año
Alcalase 2,4L®	30,95	21-12-22
Neutrase 0,8L®	22,95	21-12-22
Flavourzyme 1000L®	67,74	21-12-22
Protamex®	62,66	15-03-23

¹: Precios sin impuesto valor agregado (I.V.A.).

3.5. Análisis y caracterización de la hidrólisis enzimática

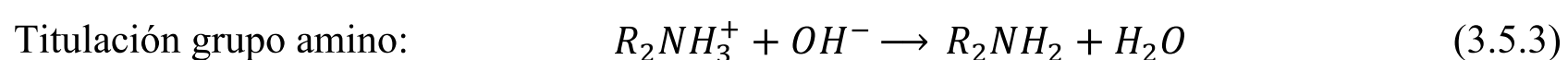
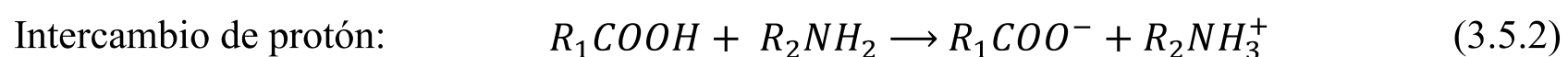
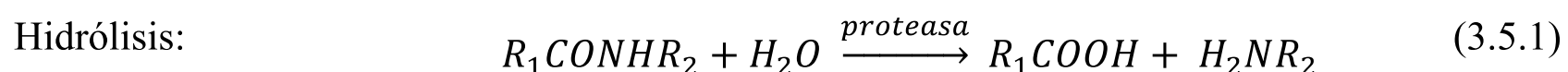
3.5.1. Cuantificación de producto: determinación de grupos α -amino liberados

La cuantificación de producto en transcurso de la reacción es necesaria para caracterizar la cinética de la hidrólisis de proteínas y determinar el GH del producto. Esto se realiza por medio de la cuantificación de los grupos alfa amino libres que se forman producto de la reacción enzimática (ver reacción en ecuación (3.5.1)).

A continuación, se describen los métodos que fueron utilizados en la presente investigación para determinar la concentración de producto en el transcurso de la reacción; método de valoración de protones con pH-stato y método espectrofotométrico con reactivo OPA. Estos fueron elegidos por ser los métodos más adecuados para la hidrólisis que se desea cuantificar y por la disponibilidad de los equipos y reactivos necesarios en el laboratorio que se realizan los experimentos de la presente investigación.

- **Valoración de los protones liberados usando pH-stato**

En un medio de reacción con pH alcalino a neutro los productos de hidrólisis de la proteína presentan un intercambio de protones como se muestra en la ecuación (3.5.2). El método de valoración de los protones usando pH-stato se basa en la valoración del grupo alfa amino protonado adicionando una base (por lo general NaOH) de forma que se mantenga constante el pH de reacción. A continuación, se muestran las reacciones involucradas en este método (Qi & He, 2006).



La cantidad de compuesto base consumido es proporcional a la cantidad de grupos alfa amino presentes ($\alpha - NH$) y, por ende, a los enlaces peptídicos hidrolizados (h). Estos pueden relacionar según la siguiente ecuación (3.5.4) (Qi & He, 2006; Valencia, et al., 2014).

$$\alpha - NH [mM] = \frac{V_{OH} \cdot N}{\alpha \cdot (V_i + V_{OH})} \quad (3.5.4)$$

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad (3.5.5)$$

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298T} \cdot 240 \quad (3.5.6)$$

Donde V_{OH} es el volumen añadido de compuesto base, V_i es el volumen inicial de reacción, N es la normalidad de la base y α es el grado de disociación promedio de los grupos alfa amino, que se calcula a partir del pH y temperatura (T) de reacción según las ecuaciones (3.5.5) y (3.5.6).

Este método se realiza con un equipo llamado pH-stato o controlador de pH, el cual monitorea el pH de la mezcla de reacción y lo mantiene constante mediante la adición de NaOH. El volumen de NaOH añadido en el tiempo es registrado por el equipo en tiempo real. En la [Figura 11](#) se muestra un esquema de la instalación experimental típica para llevar a cabo el método de valoración de protón con pH-stato (Kristinsson & Rasco, 2000 a).

Este método de cuantificación resulta sencillo y rápido de ejecutar, su mayor ventaja es que no requiere de toma de muestras, pues es un método continuo y directo. Sin embargo, este método se limita a reacciones con pH alcalino a neutro y no es útil para estudiar reacciones sin control de pH. Además, la adición de compuesto base es indeseable para la utilización del producto final, por lo que este método no es aplicable en los procesos industriales de alimentos (Nielsen, et al., 2001; Aspevik, et al., 2016).

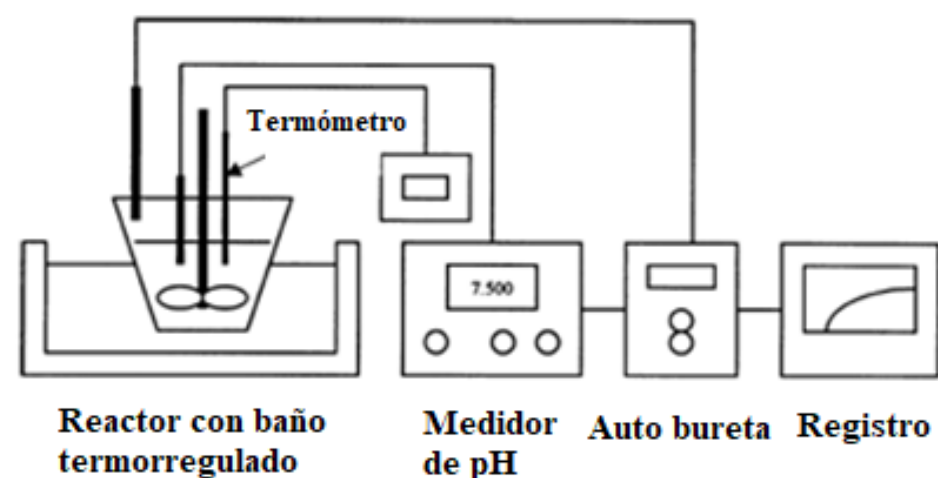


Figura 11. Esquema instalación experimental método valoración con pH-stato. Obtenido y traducido de (Kristinsson & Rasco, 2000 a).

- **Cuantificación por espectrofotometría: Método OPA**

Este método se basa en la cuantificación de los grupos alfa amino libres a partir de la reacción con *o*-ftaldialdehído (OPA) en presencia de ditioneol (DTT), en la cual se forma un compuesto cromóforo detectable a 340nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Nielsen, et al., 2001). En la Figura 12 se muestra la reacción del OPA con el grupo alfa amino terminal (de un péptido o proteína) y el grupo tiol (terminal SH) del reactivo DTT.

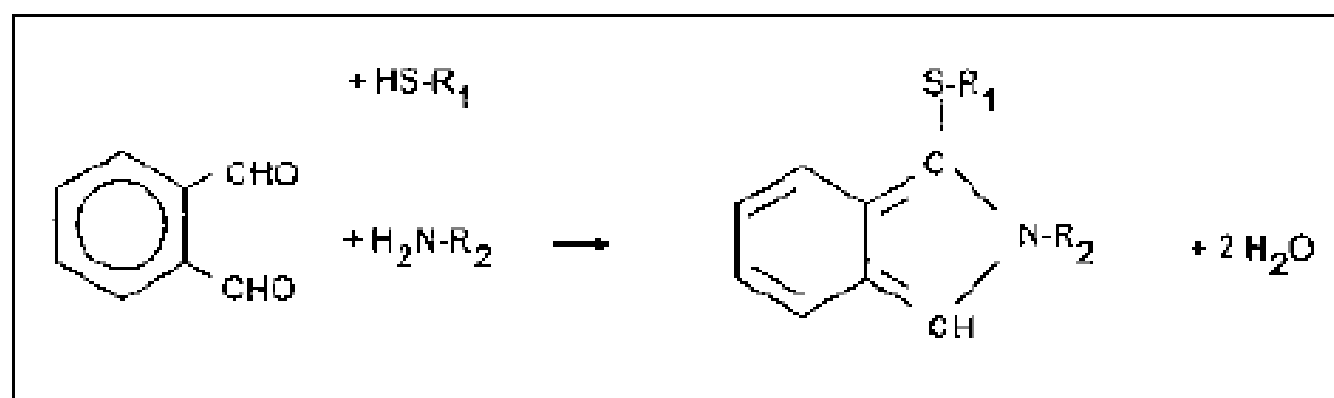


Figura 12. Reacción método OPA. Obtenido de (Nielsen, et al., 2001)

La cuantificación del compuesto cromóforo formado se realiza usando serina como compuesto estándar para elaborar la curva de calibración, ya que tiene una respuesta muy similar a la respuesta promedio de los aminoácidos (Nielsen, et al., 2001). El método OPA fue descrito en detalle por Nielsen et al (2001), su procedimiento se encuentra en el [Anexo E: Procedimiento Método OPA](#). Para realizar el seguimiento del avance de la reacción es necesario realizar toma de muestras, las cuales deben inactivarse rápidamente para evitar que la reacción continúe desarrollándose en el volumen muestreado.

Una desventaja de este método es que el OPA solo reacciona con los aminoácidos, péptidos y proteínas solubles, pero al hidrolizarse un enlace peptídico no siempre se obtienen productos solubles, sobre todo en la primera etapa de la hidrólisis de proteínas. Entonces, al utilizar el método OPA se estará subestimando la cantidad de enlaces peptídicos hidrolizados en la reacción.

3.5.2. *Grado de hidrólisis*

El grado de hidrólisis (GH) es un parámetro que se utiliza para realizar un seguimiento y control del avance de la reacción de hidrólisis (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008). Se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos, producto de la reacción de hidrólisis, y se calcula como la razón porcentual entre los enlaces peptídicos hidrolizados (h) y los enlaces peptídicos totales contenidos en la proteína (h_{tot}) como se muestra en la ecuación (3.5.7) (Adler-Nissen, 1979).

$$GH = \frac{h}{h_{tot}} * 100\% \quad (3.5.7)$$

El grado de hidrólisis es uno de los parámetros de caracterización más utilizados de la hidrólisis de proteínas (Benítez, Ibarz, & Pagan, 2008). Su importancia radica en que depende de las condiciones de reacción (S, E, T, tiempo, pH, E/S) y se relaciona con las propiedades funcionales que tendrá el hidrolizado final y, por ende, su aplicación. Así se puede controlar la hidrólisis enzimática solo controlando el parámetro GH y dejando sin control las condiciones de reacción (Kristinsson & Rasco, 2000 b).

Los enlaces peptídicos hidrolizados (h) se relacionan con la cantidad de nuevos grupos alfa-amino libres en la mezcla de reacción. Ya que, por cada enlace peptídico hidrolizado se origina un péptido con un grupo alfa-amino libre (ver reacción (3.5.1)) (Qi & He, 2006).

La gran mayoría de los métodos para determinar los enlaces peptídicos hidrolizados se basa en la cuantificación de los grupos alfa amino libres, como lo son los métodos de espectrofotometría, método por osmometría y la valoración del protón con pH-stato (Kristinsson & Rasco, 2000 a).

3.5.3. *Recuperación de nitrógeno*

La recuperación de nitrógeno (RN) es un parámetro que es usado para caracterizar hidrólisis de fuentes de proteínas no solubles, como es el caso de los hidrolizados de pescado. Representa la transformación de proteínas insolubles, contenidas en una fase sólida, a péptidos solubles contenidos en el hidrolizado (fase acuosa de la reacción). Este parámetro corresponde al porcentaje de nitrógeno transferido de la fuente de proteica insoluble a la fase soluble y se calcula según la ecuación (3.5.8) (Valencia, et al., 2021)

$$RN = \frac{\text{nitrógeno total fase soluble (mol)}}{\text{nitrógeno total en la mezcla de reacción(mol)}} * 100\% \quad (3.5.8)$$

3.5.4. *Cinética y modelamiento de la hidrólisis enzimática*

La hidrólisis enzimática con proteínas de pescado se caracteriza cinéticamente por tener una fase inicial rápida, durante la cual se hidrolizan gran número de enlaces peptídicos. Luego la velocidad de reacción decae en el transcurso del tiempo hasta llegar a una fase estacionaria en la cual no hay

más formación de producto (Kristinsson & Rasco, 2000 a). Esto se asocia con la acumulación de producto, inactivación de la enzima y la inhibición de la enzima por parte de uno o más de los productos de la reacción (Qi & He, 2006).

Para modelar una hidrólisis enzimática a menudo se utiliza el modelo cinético simple de Michaelis-Menten (Kristinsson & Rasco, 2000 a), sin embargo, en este modelo la velocidad de reacción solo depende de la concentración del sustrato, sin considerar la complejidad del proceso, la inactivación de la enzima y las inhibiciones presentes (Valencia, et al., 2015). Un modelo más adecuado es el modelo semi-empírico de la ecuación logarítmica ya que se considera la inactivación e inhibición de la enzima (Valencia, et al., 2015). Este modelo fue propuesto inicialmente por Marquez-Moreno y Fernandez-Cuadrado (Márquez-Moreno & Fernandez-Cuadrado, 1992), quienes basándose en los mismos mecanismos cinéticos de Michaelis-Menten pero con una deducción matemática diferente obtuvieron una ecuación logarítmica de la integración de la ecuación **(3.5.9)**, en la cual se modela el grado de hidrólisis (GH) en función del tiempo (t). Los parámetros a' y b' corresponden a dos constantes cinéticas empíricas.

$$\frac{dGH}{dt} = a' \exp(-b'GH) \quad (3.5.9)$$

Posteriormente, Qi y He realizaron la deducción de una serie de expresiones para los parámetros cinéticos a' y b' para distintos casos de mecanismos de reacción; i) sin inhibición, pero con inactivación de la enzima, ii) con inhibición no competitiva por sustrato e inactivación, iii) con inhibición competitiva por producto e inactivación y iv) con ambas inhibiciones e inactivación (Qi & He, 2006). Estas expresiones y las reacciones consideradas en cada caso se muestran en la [Tabla 4](#).

Valencia et al. (2015) propuso expresar la ecuación **(3.5.9)** en función del producto de reacción y luego integrarla para dejarla de una forma más conveniente de trabajar, obteniendo la ecuación logarítmica **(3.5.14)** (Valencia, et al., 2015). En la cual los parámetros a y b se relacionan con los obtenidos por Qi y He como se muestra en las expresiones **(3.5.15)** (Valencia, et al., 2019).

$$P = \frac{1}{b} \ln(abt + 1) \quad (3.5.14)$$

$$a = a'S_0 \quad ; \quad b = \frac{b'}{S_0} \quad (3.5.15)$$

Esta última forma del modelo cinético, ecuación **(3.5.14)**, es la que se usará para la presente investigación, determinando los parámetros de manera empírica para caracterizar la cinética de los experimentos.

Tabla 4. Expresiones cinéticas para los parámetros a' y b' del modelo logarítmico correspondientes a la Ec. (3.5.8).
Obtenido y adaptado de (Qi & He, 2006).

Mecanismo Reacciones	a'	b'
i) Sin inhibición $E + S \xrightleftharpoons{K_m} ES \xrightarrow{k_2} E + P \quad (3.5.10)$ $E + ES \xrightarrow{k_3} E_A + E_I + P \quad (3.5.11)$	$\frac{k_2 e_0}{s_0}$	$\frac{k_3 K_m}{k_2}$
ii) Inhibición por sustrato $ES + S \xrightleftharpoons{K_s} SES \quad (3.5.12)$ Más (3.5.10) y (3.5.11)	$\frac{k_2 e_0 K_s}{K_s s_0 + s_0^2}$	$\frac{k_3 K_m K_s}{k_2 (K_s + s_0)}$
iii) Inhibición por producto $E + P \xrightleftharpoons{K_p} EP \quad (3.5.13)$ Más (3.5.10) y (3.5.11)	$\frac{k_2 e_0 K_p}{K_p s_0 + K_m p}$	$\frac{k_3 K_m K_p s_0}{k_2 (K_p s_0 + K_m p)}$
iv) Inhibición por sustrato y producto (3.5.10), (3.5.11), (3.5.12) y (3.5.13)	$\frac{k_2 e_0 K_s K_p}{K_s K_p s_0 + K_p s_0^2 + K_m K_s p}$	$\frac{k_3 K_m K_s K_p s_0}{k_2 (K_s K_p s_0 + K_p s_0^2 + K_m K_s p)}$

Subíndices A e I corresponden a activa e inactiva respectivamente, S_0 es la concentración inicial de sustrato, e_0 es la concentración inicial de enzima, p es la concentración de producto. Constantes de equilibrio $K_M = k_{-1}/k_1$; $K_S = k_{-4}/k_4$; $K_P = k_{-5}/k_5$.

En el trabajo de Valencia et al. (2019) se incorpora y demuestra el significado operacional de los parámetros a y b , permitiendo usarlos para caracterizar el desarrollo de la reacción enzimática tanto en la fase inicial como en etapas más avanzadas (Valencia, et al., 2019). El significado operacional del parámetro a se demuestra al derivar en el tiempo la ecuación (3.5.15) y aplicar el límite cuando t tiende a cero como se muestra a continuación.

$$\frac{dP}{dt} = \frac{ab}{b(abt + 1)} \tag{3.5.16}$$

$$\lim_{t \rightarrow 0} \left(\frac{dP}{dt} \right) = a \tag{3.5.17}$$

La ecuación (3.5.17) nos muestra que el parámetro a corresponde a la pendiente inicial de la gráfica de producto versus tiempo, es decir que corresponde a la velocidad inicial de reacción (Valencia, et al., 2019). La velocidad inicial corresponderá a la velocidad máxima de reacción cuando la concentración de sustrato es mucho mayor a K_m ($[S] \gg K_m$).

El significado operacional del parámetro b no es tan sencillo de demostrar, pero se relaciona con la caracterización de la reacción en fases avanzadas de esta. Ya que, cuando $abt \gg 1$ la ecuación (3.5.16) se puede aproximar a la siguiente expresión.

$$\frac{dP}{dt} \approx \frac{1}{bt} ; \text{cuando } abt \gg 1 \quad (3.5.18)$$

Esta aproximación (3.5.18) nos muestra que el parámetro b se relaciona con la velocidad de reacción en fases avanzadas de la hidrólisis (Valencia, et al., 2019). Ya que, cuando el tiempo de reacción es lo suficientemente grande para que el producto $abt \gg 1$, la pendiente del gráfico producto versus tiempo tenderá a $(bt)^{-1}$.

Una aplicación muy útil de los parámetros a y b del modelo logarítmico es la utilización de la razón a/b como indicador cuantitativo de la susceptibilidad de la proteína específica frente al ataque catalítico de la proteasa (Valencia, et al., 2019). Ya que, al escribir la relación a/b en función de las expresiones obtenidas por Qi & Hi (presentadas en Tabla 4) y considerando la relación entre los parámetros de la ecuación (3.5.15) se obtiene la expresión (3.5.19) independiente del mecanismo de reacción que se evalúe. Es decir, para cualquiera de los casos presentados en la Tabla 4, el resultado de a/b será la misma expresión que se muestra a continuación.

$$\frac{a}{b} = (k_2 e_0) \left(\frac{k_2}{k_3} \right) \left(\frac{S_0}{K_m} \right) \quad (3.5.19)$$

El significado operacional de esta relación se obtiene al identificar los 3 distintos términos. El primer término, $(k_2 e_0)$, corresponde a la máxima velocidad de reacción y representa la eficiencia catalítica de la proteasa sobre cierta proteína en particular. El segundo término, (k_2/k_3) , es la relación entre la eficiencia catalítica (k_2) y la velocidad de inactivación de la proteasa (k_3), que dependen de la temperatura de reacción, existiendo así una relación (k_2/k_3) óptima respecto a la temperatura. El tercer término, (S_0/K_m) , corresponde a la concentración de sustrato adimensional, que define el orden de reacción y afecta a la dinámica del avance de la reacción. Cuando la enzima se encuentra saturada con sustrato, es decir que $(S_0/K_m) \geq 1$, el orden de reacción tiende a cero, y cuando no se encuentra saturada, es decir que $(S_0/K_m) < 1$, la reacción tiende a ser de primer orden (Valencia, et al., 2019).

La razón a/b presentada en la ecuación (3.5.19) es llamada susceptibilidad proteolítica y es útil para comparar las hidrólisis de distintos sustratos con una proteasa en particular, o bien, comparar las hidrólisis de un mismo sustrato con distintas proteasas (Valencia, et al., 2019).

3.5.5. Determinación de actividad enzimática

Como se mencionan anteriormente, uno de los criterios de selección de la proteasa es la eficiencia, es decir, cantidad de enzima utilizada frente a la cantidad de sustrato convertido en productos en

un intervalo de tiempo. La eficiencia de la enzima se puede cuantificar como actividad enzimática. La actividad enzimática corresponde la velocidad inicial de conversión de sustrato cuando el efecto de la acumulación de producto no sea significativo, esto es el límite dP/dt cuando $t \rightarrow 0$ (Scopes , 2002). Gráficamente la actividad o velocidad inicial corresponde a la pendiente de la primera parte lineal de la curva de reacción.

El objetivo de medir la actividad enzimática comúnmente es para determinar la cantidad de enzima presente, bajo condiciones de reacción definidas, y para realizar comparaciones entre una muestra y otra (Scopes , 2002). Para esta investigación se realiza la medición de la actividad enzimática de distintas proteasas para realizar experimentos con igual concentración de actividad y que estos puedan ser comparables entre sí. Su cuantificación se realiza por medio de ensayos de actividad, los cuales pueden realizarse con sustratos sintéticos o naturales y pueden ser del tipo continuo o discontinuo, según el seguimiento de la medición (Scopes , 2002). Un ensayo enzimático es exitoso cuando se logra medir la formación de producto antes de que la acumulación de producto afecte la velocidad inicial, es decir que el ensayo debe ser lineal (Scopes , 2002).

Las condiciones de reacción que se utilizan para los ensayos de actividad comúnmente son pH y temperaturas óptimas para la proteasa en específico y concentración sustrato saturada. El tiempo del ensayo suele ser entre 10-30 min, pueden ser tiempos mayores siempre que se cumpla la linealidad del ensayo, pero deben evitarse tiempos muy cortos (por ejemplo 2 minutos) ya que un mínimo retraso en la adición de enzima o en detener la reacción puede conducir a grandes errores (Földesi, 2019). Existen ensayos estandarizados con sustratos sintéticos para identificar y cuantificar actividades endoproteolítica y exoproteolítica por separado, sin embargo, en esta investigación nos enfocamos en ensayos diseñados para proporcionar estimaciones de la actividad global de la peptidasa (actividad endo y exo peptídica global) (Akpınar & Penner , 2002).

- **Ensayos de tipo discontinuo**

Los ensayos de tipo discontinuo o más comúnmente llamados “de punto final” son con los cuales se determina la actividad enzimática midiendo solo la cantidad de producto obtenido en un tiempo determinado (Scopes , 2002). Así estos ensayos suelen tener dos puntos; el punto inicial y el punto final de la reacción, los cuales se unen con una recta realizando la suposición de que la reacción se encuentra en la zona lineal de la curva. Esto último no siempre es válido, por lo que es importante que los ensayos “de punto final” se verifiquen con diferentes concentraciones de enzima para garantizar la linealidad del ensayo. Los ensayos suelen ser lineales si la conversión del sustrato es menor al 15%, siempre que no haya otros factores limitantes (Földesi, 2019).

En la [Figura 13](#) se muestra un ejemplo gráfico de la absorbancia obtenida luego de un ensayo “de punto final” con distintas diluciones de enzima, en el cual se observa que el rango de dilución adecuado para el ensayo es entre 0,00 y 0,02. Además, se ilustra la importancia de realizar este estudio previo para evitar errores de subestimación, ya que si se usa una mayor concentración de

enzima se puede obtener igualmente una línea recta, pero con una pendiente reducida, lo que quiere decir que estaremos subestimando el valor de actividad (Földesi, 2019).

Para los ensayos discontinuos es necesario detener rápidamente la reacción, desnaturalizando la enzima apenas se cumpla el tiempo del ensayo, lo cual se realiza comúnmente con la adición de un ácido fuerte, detergentes o agentes complejantes como el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (Scopes , 2002). Además, se debe considerar un método que permita cuantificar el producto en presencia del sustrato o viceversa, o bien, considerar un método de separación para los productos. Para cuantificar el producto se suele utilizar algún método basado en la reacción de un compuesto cromóforo para cuantificarlo mediante espectrofotometría.

Existen distintos ensayos estandarizados para determinar la actividad de las proteasas en los cuales se usa un sustrato específico (proteínas naturales o modificadas) que permita una fácil cuantificación de su producto, entre ellos se encuentran ensayos con sustrato de albúmina de suero bovino (BSA), ensayos con sustrato de caseína o hemoglobina usando ácido bicinonínico (BCA) como compuesto cromóforo y ensayos con azo-proteínas como la azocaseína que se encuentran unidos al compuesto cromóforo Azofenilsulfonato.

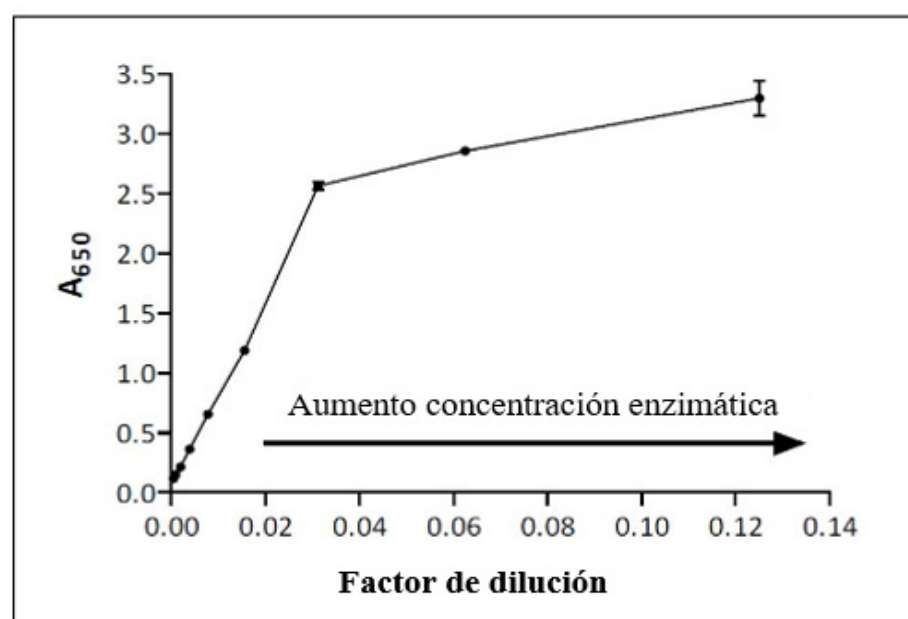


Figura 13. Gráfico Absorbancia obtenida vs cantidad de enzima usada en ensayo de actividad. Ejemplo ilustrativo de verificación linealidad. Obtenido y traducido de (Földesi, 2019)

- **Ensayos de tipo continuo**

Los ensayos de actividad del tipo continuo son en los cuales se realiza una lectura continua en tiempo real del producto generado o sustrato consumido, permitiendo un seguimiento continuo de la reacción enzimática. Este tipo de ensayos resultan ser más convenientes que los discontinuos, pues el resultado se obtiene inmediatamente y no se necesitan más ensayos para comprobar la linealidad de la reacción (Scopes , 2002). Además, no es necesario detener la reacción ni separar los productos, pero si se debe contar con un método de detección y cuantificación del producto o sustrato en tiempo real. Para esto se suele utilizar el método de pH-stato, con el cual se logra cuantificar los protones liberados en el transcurso de la reacción con ayuda de un equipo auto titulador.

3.6. Casos de estudio

A continuación, se presentan observaciones, discusiones y conclusiones de distintas investigaciones que se utilizaron como base para el diseño inicial de los experimentos que se realizan para el presente trabajo.

Para lograr que la producción de hidrolizados de subproductos de pescado sea implementada a nivel industrial, es necesario disminuir los costos de producción y desarrollar productos finales de alto valor agregado al mercado con hidrolizado de características específicas. El presente trabajo espera contribuir al desarrollo industrial de la producción de hidrolizados de subproductos de salmón entregando antecedentes de la hidrólisis con distintas proteasas comerciales en condiciones de reacción deseables para la industria, es decir, condiciones que disminuyan los costos de operación.

En el trabajo de título de Oscar Vera (2016) se realiza una evaluación económica de la hidrólisis de subproductos de pescado con Alcalase 2,4L en reactor por lotes, evidenciándose la importancia del consumo de la enzima sobre los costos operacionales de la hidrólisis, el cual representó más del 80% del total de los costos operaciones en todos los casos estudiados (GH 5, 10, 15 y 20%) (Vera, 2016).

Respecto a los costos de producción totales, la etapa de secado del hidrolizado es la que presenta mayor consumo energético y, por ende, un alto costo de operación (Kristinsson & Rasco, 2000 a). Para minimizar el costo del secado, Pedro Valencia et al. (2021) propone realizar la hidrólisis de esquelón de salmón con Alcalase sin adición de agua en el pretratamiento. A partir de experimentos con 3 proporciones esquelón: agua (1:0; 3:1 y 1:1) se obtiene que la hidrólisis sin adición de agua es factible y más conveniente que los casos con adición de agua (3:1 y 1:1) en términos de cantidad de grupos alfa amino liberados (Valencia, et al., 2021). En este trabajo también se evalúa la dosificación máxima de Alcalase que supondría un aumento de la conversión de proteínas a péptidos, para lo cual realizó experimentos con dosis de 20, 13 y 6 [UA/kg esquelon], obteniéndose que a partir de la dosis de 13UA/kg no se evidencia un aumento en la eficiencia de la reacción con el incremento de la dosificación enzimática. Es decir que si utiliza una dosis mayor se obtendrá la misma conversión de producto que con 13UA/kg, lo cual implicaría un aumento de los costos de operación sin beneficio alguno (Valencia, et al., 2021).

Respecto a la variedad de proteasas comerciales disponibles, es de suma importancia la selección adecuada de la proteasa que se utilizará para la hidrólisis, no solo desde el punto de vista de los costos operacionales, también desde el punto de vista de la calidad y funcionalidad del producto final. Kristinsson y Rasco (2000 b) en su trabajo comentan que una limitación importante de la investigación de los hidrolizados de proteína de pescado es la falta de comparaciones de proteasas comerciales usando en el mismo nivel de actividad. Muchos investigadores realizan comparaciones entre proteasas usando la misma dosificación en volumen o usando la dosificación recomendada para cada enzima, pero lo más adecuado es compararlas con la misma dosificación

en unidades de actividad proteolítica, de esta forma se puede evidenciar los efectos de la especificidad e inhibiciones que pueda tener en mayor medida una proteasa que otra.

Para aportar comparaciones de proteasas válidas, Kristinsson y Rasco (2000 b) realizaron un estudio de la cinética de reacción de 4 proteasas comerciales alcalinas (Alcalase, Flavourzyme, Corolase PN-L, Corolase 7089) y una proteasa serina extraída de las vísceras de salmón. El trabajo incluyó ensayos de actividad con sustrato sintético Azocoll® (Azo-colágeno) y experimentos de hidrólisis con sustrato de musculo de salmón en el mismo nivel de actividad enzimática, obteniéndose que la mayor actividad enzimática la presentó la Alcalase y en los experimentos se obtuvo un mayor GH con corolase 7089. Además, evaluaron el costo de la enzima por unidad de actividad enzimática, obteniéndose la Alcalase como proteasa más rentable.

En el trabajo de Aspevick et al. (2016) se realiza una evaluación del costo-efectividad de 5 endoproteasas comerciales al mismo nivel de actividad (Alcalase 2,4L, Corolase 7089, Neutrase 0,8L, Promod 671L y Protex 7L), realizando ensayos de actividad con caseína e hidrólisis con esquelón y cabezas de salmón con adición de agua 1:1. Se determinó el costo por unidad de actividad obteniéndose que la más rentable es Protex 7L (Aspevik, et al., 2016).

En este trabajo se realizó la evaluación del costo por unidad de actividad de la proteasa de manera similar a la presentada por Kristinsson y Rasco (2000 b) y Aspevik et al. (2016), pero con la diferencia de que se realizaron dos tipos ensayos de actividad; un ensayo estándar con sustrato sintético (azocaseína) y otro ensayo específico con sustrato de esquelón de salmón, que viene siendo el sustrato de interés en este trabajo. De esta forma realizar una comparación de la hidrólisis en una misma concentración de actividad obtenida para el sustrato de esquelón de salmón y estudiar su susceptibilidad proteolítica frente a proteasas con diferente especificidad y origen. También se evaluó si existe correlación entre los dos ensayos. La evaluación del costo por unidad de actividad se realizó para las dos unidades de actividad correspondientes a cada tipo de ensayo, para sea de utilidad tanto para procesos con esquelón de salmón y procesos con otras fuentes proteicas. Los experimentos de hidrólisis se realizaron con concentraciones de proteasa equivalentes respecto a la actividad del ensayo con esquelón de salmón.

IV. METODOLOGÍA

La evaluación del desempeño de las proteasas comerciales; Alcalase® 2,4L, Protamex®, Flavourzyme® 1000L y Neutrase® 0,8L, durante la hidrólisis de esquelones de salmón al 100% de subproducto y sin control ni ajuste de pH en tres concentraciones de proteasa (equivalentes a 13; 6,5 y 3,25 [AU/kg esq] de Alcalase 2,4L), se realizó según la estrategia que se resume en la Figura 14 y se detalla a continuación.

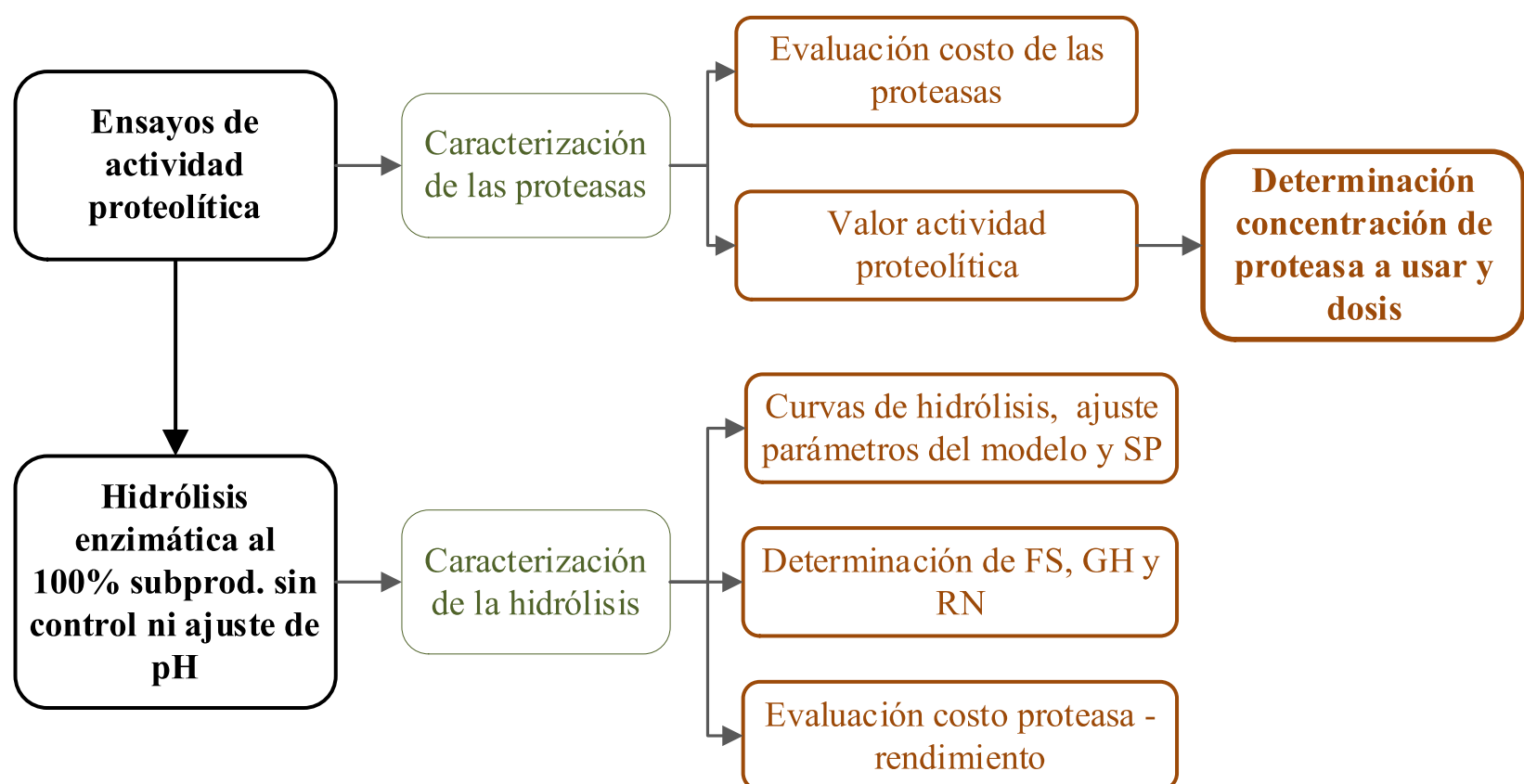


Figura 14. Esquema de metodología para la experimentación. En color negro se muestra la experimentación, en verde la caracterización derivada de cada etapa y en naranja los parámetros de caracterización obtenidos.

Elaboración propia

Para realizar los experimentos de hidrólisis con distintas proteasas en concentraciones de proteasa equivalentes, fue necesario primero caracterizar sus actividades proteolíticas en una misma unidad realizando un ensayo de actividad en común para todas las proteasas evaluadas. Una vez obtenidos los valores de actividad específica, se obtuvo la equivalencia de las concentraciones de proteasa en unidades del ensayo de actividad con esquelón [Us/g esq] con las concentraciones de 13; 6,5 y 3,25 [mAU/g esquelón] de la Alcalase 2,4L relacionando el valor de la actividad de dicha proteasa en ambas unidades. Con las concentraciones de proteasa a evaluar definidas en unidades [Us/g esq] y los valores de actividad de cada preparación de proteasas en unidades [Us/g enz], se pudo calcular la dosis (en masa o volumen) que se debe agregar a los experimentos al 100% de subproducto y sin control ni ajuste de pH.

Entonces como primera etapa se tiene la realización de ensayos de actividad para caracterizar los preparados de proteasas comerciales, de los cuales se obtuvo los valores de actividad de cada uno de ellos, luego las concentraciones de proteasa equivalentes a 13; 6,5 y 3,25 [mAU/g esquelón] de la Alcalase 2,4L y la dosis en volumen a utilizar en los experimentos al 100% subproducto. Con

la caracterización de la actividad de las proteasas también se realizó una evaluación del costo de las preparaciones de proteasa comerciales por unidad de actividad proteolítica.

Luego, la segunda etapa consistió en la realización de los experimentos de hidrólisis de proteínas de esquelón de salmón al 100%. La cual se realizó a 50°C, con pH inicial nativo y sin control (pH nativo 6,5 aprox.) por 60 min de reacción. De esta etapa se obtuvo la caracterización de la hidrólisis. La caracterización del desarrollo de la hidrólisis se realizó mediante de la determinación de los grupos α -amino liberados en el transcurso de la reacción. Para lo cual se tomaron muestras periódicamente durante los 60 min de la hidrólisis y se analizaron con la técnica OPA. Luego, con las curvas de hidrólisis se obtuvo el ajuste de los parámetros a y b del modelo logarítmico y se calcula la susceptibilidad proteolítica (SP) como la razón a/b . La caracterización del hidrolizado final obtenido se realizó mediante la determinación de la fracción soluble (FS), recuperación de nitrógeno a la fase soluble (RN) y grado de hidrólisis alcanzado (GH). Con la caracterización del hidrolizado también se realizó una evaluación del costo de proteasa- rendimiento de la hidrólisis, calculando el costo en proteasa del experimento por masa de nitrógeno recuperado a la fase soluble en la hidrólisis. A continuación, se describe en detalle los materiales, métodos y análisis realizados.

4.1. Materiales

4.1.1. *Materia Prima: Esquelón de salmón molido*

La materia prima que se utilizó como sustrato de la hidrólisis es una pulpa hecha con esquelones de salmón. Los esquelones corresponden al subproducto resultante del fileteado del salmón, que contiene la columna vertebral de este, los cuales están compuestos por huesos y músculo adherido (ver [Figura 15](#)). Los esquelones de salmón fueron facilitados por la empresa Fiordo Austral (Pto Montt, Chile), quienes enviaron los esquelones enteros, sellados y congelados.



Figura 15. Fotografía referencial de los esquelones de salmón enteros (previo a molienda).

Luego, estos fueron procesados mediante corte con el equipo Talsa PSV C15 (Valencia, España) y molienda con el equipo RCA RH-950 Inox (Santiago, Chile) para obtener la pulpa, que fue separada en porciones de 500g y congeladas para su posterior uso. Se enviaron muestras a un laboratorio externo para la determinar su composición, la cual se muestra en la [Tabla 5](#). El contenido de proteína se calcula a partir del contenido de nitrógeno orgánico por el método Kjeldahl con factor F_p igual a 6,25 [g_N/g_P].

Tabla 5. Composición del esquelón de salmón molido. Elaboración propia.

Ítem	Valor	Unidad
Materia Grasa	23,0	[g/100g]
Azucares totales	< 2,07	[g/100g]
Cenizas	0,07	[g/100g]
Energía	271	[kcal]
Hidratos de carbono totales	0,07	[g/100g]
Humedad estufa al vacío	53,05	[g/100g]
Proteínas	15,83	[g/100g]
Sodio	130	[mg/100g]

4.1.2. Equipos

Tabla 6. Listado de equipos utilizados. Elaboración propia.

Etapas	Equipo	Marca, Modelo
Preparación esquelón de salmón molido	Cortadora de alimentos	Talsa PSV C15
	Moledora de carne	RCA RH-950 Inox
Ensayo de actividad con azocaseína	Agitador magnético con placa calefactora	JKI, JK-DMS-HS
	Baño seco	Labnet, D1200
	Espectrofotómetro	Thermo Scientific, Orion AquaMate 8000
Ensayo de actividad con esquelón de salmón	Baño de agua termorregulado	Thermo Fisher Scientific, HAAKE, W13 Julabo, ED (termorregulador)
	Equipo autotitulador	Mettler Toledo, valorador compacto G20
	Electrodo de valoración	Mettler Toledo, DG1115-SC
Hidrólisis enzimática al 100% subproducto	Baño de agua termorregulado	Thermo Fisher Scientific, HAAKE S21P
	Rotor para agitación	IKA Eurostar, EURO-ST P CV
	Agitador	Fabricado en UTFSM
	Electrodo de pH	Mettler Toledo, DG111-SC
	Termocupla	Mettler Toledo, DT100
Separación de fases	Centrífuga eppendorf	Labnet Prism, C2500
	Centrífuga refrigerada	Hettich, Rotina 420R
Conservación de muestras y sustrato	Congelador	DAEWOO ELECTRONICS
Hidrólisis total de fracción soluble	Baño seco	Labnet, D1200
Cuantificación de grupos alfa-amino	Espectrofotómetro	Thermo Scientific, Orion AquaMate 8000
General	Balanza analítica	Sartorius, PRACTUM224-1S
	Balanza	METTLER TOLEDO, PL1502-S
	Agitador vortex	VELP, ZX3

4.2. Ensayos de actividad proteolítica

Se realizaron dos tipos de ensayos para determinar la actividad proteolítica de las preparaciones comerciales de proteasa, uno de tipo “punto final” y uno de tipo continuo; el ensayo con azocaseína y el ensayo con esquelón de salmón respectivamente.

El ensayo con azocaseína corresponde a un método estandarizado basado en la absorbancia de los productos peptídicos conjugados con un cromóforo, el cual se realiza usando azocaseína como sustrato. Este ensayo se realiza bajo las condiciones; 1%(m/v) de azocaseína en solución tampón sodio-fosfato pH 7,5 y 10 min de incubación a 50 °C. El segundo ensayo realizado es análogo al ensayo de azocaseína en cuanto a concentración de proteína, temperatura, pH y tiempo de ensayo, pero en este caso se utiliza el esquelón de salmón molido como sustrato y para cuantificar los productos se utiliza el método de valoración del protón con pH-stato.

El ensayo de azocaseína es del tipo discreto o “de punto final”, es decir que solo se conoce la cantidad de producto producido al finalizar los 10 min de reacción. Mientras que el ensayo con esquelón de salmón es del tipo continuo, gracias al método de cuantificación del producto en el tiempo pH-stato, nos es posible obtener las curvas de hidrólisis de cada ensayo que se realice, de esta forma podemos obtener más acertadamente el valor de velocidad inicial usando el parámetro α del modelo logarítmico ajustado. Cabe mencionar que el ensayo con azocaseína es considerablemente más rápido de ejecutar en comparación con el ensayo con sustrato de esquelón de salmón. Otra observación importante es que una vez que se ha verificado la linealidad de la curva de actividad para cierto sistema sustrato-enzima, se puede realizar un solo ensayo, con una concentración de enzima dentro del rango lineal verificado y a partir de este determinar la actividad proteolítica directamente, sin necesidad de elaborar la curva de actividad de nuevo. Esto último aplica para los dos tipos de ensayos.

A continuación, se detalla el procedimiento de cada ensayo, los materiales y consideraciones para su realización, así como la definición de las unidades de actividad respectivas.

4.2.1. Ensayo con azocaseína

El ensayo de actividad con azocaseína como sustrato se encuentra descrito por Akpinar y Penner (2002). El procedimiento detallado del ensayo realizado se encuentra en el [Anexo A: Ensayo de actividad proteolítica con azocaseína](#).

Se realizó el ensayo con 4 concentraciones distintas de proteasa, más el ensayo de blanco, para verificar la linealidad de la curva de actividad de cada proteasa evaluada, es decir que se realizaron 20 ensayos de actividad con azocaseína en total, cada uno realizado en duplicado. Las diluciones de proteasa que se utilizan en los ensayos, así como la cantidad de proteasa correspondiente, se encuentran en el [Anexo B: Diluciones enzimas para ensayos con azocaseína](#). Las concentraciones de proteasa ensayadas se determinaron a partir de ensayos preliminares.

- **Unidad actividad proteolítica [U] y actividad específica [U/g]**

Se define la unidad de actividad proteolítica del ensayo con azocaseína U como la cantidad de proteasa que produce un cambio en 1,0 unidad de absorbancia medida a 440 nm en cubeta de 1 [cm], por minuto de reacción bajo las condiciones del ensayo con azocaseína (azocaseína 1% (m/v), pH 7,5, 50°C por 10 min). Desde ahora en adelante la unidad U se referirá únicamente a la actividad proteolítica obtenida del ensayo con azocaseína descrito en el [Anexo A](#).

Teniendo en cuenta esta definición, el valor de la actividad proteolítica específica en función de los gramos de preparado comercial de proteasas (unidades [U/g enz]) se obtuvo calculando la pendiente de la curva de actividad [U/mL ensayo] frente concentración de enzima [g enz/mL ensayo] verificando la linealidad de la curva obtenida. Donde la actividad en unidades [U/mL ensayo] de cada ensayo (i) se obtiene según la ecuación (4.2.1).

$$Actividad (i) \left[\frac{U}{mL \text{ ensayo}} \right] = \frac{Abs \ 440nm (i) - Abs \ 440nm(blanco)}{10 [min]} \quad (4.2.1)$$

4.2.2. *Ensayo con esquelón de salmón*

Se realizaron ensayos con esquelón de salmón con 5 concentraciones distintas de proteasa y un ensayo de autólisis que sirvió para todas las proteasas evaluadas, es decir que se realizaron 21 ensayos con esquelón de salmón en total. Cada uno de estos ensayos se realizó en duplicado. En el [Anexo C: Volumen enzimas para ensayos con esquelón de salmón](#), se encuentra el volumen de proteasa agregado y la concentración de proteasa respectiva de cada uno de los 21 ensayos.

Para este ensayo de actividad proteolítica primero se debe considerar que, a diferencia de la azocaseína, el esquelón de salmón molido no está compuesto únicamente por proteína. Por esto se debe usar la fracción en masa de proteína en el esquelón (0,1583 [g proteína/g esquelón]) para determinar la cantidad de esquelón que se debe añadir al volumen de reacción para obtener una solución al 1% (m/v) de proteína. Para este ensayo, se usa un volumen de reacción de 50[mL], por lo cual es necesario añadir 3,16[g] de esquelón de salmón molido. A continuación, se presenta el procedimiento del ensayo paso a paso.

- **Procedimiento**

Soluciones y reactivos

- Sustrato de interés al 1% de proteína: esquelón de salmón molido.
- Agua desionizada
- Gotarios con soluciones de NaOH de distintas concentraciones para ajustar pH inicial
- Solución de NaOH 0,05N estandarizada como solución valorante.

Preparación equipos

- Encender equipo autotitulador y calibrar electrodo pH 7-10 con solución de referencia, buscar en métodos del equipo “calibrar DG1115-SC pH 7-10”.
- Colocar frasco con solución de NaOH 0,05N estandarizada en la alimentación de la bureta del equipo y en la opción “manual” seleccionar “lavar bureta” con al menos 3 ciclos para ambientarla correctamente.
- Encender baño de agua termorregulado a 50°C, verificar nivel.
- Abrir programa LabX en computador para el registro de los datos.

Preparación sustrato al 1% (m/v) de proteína

- En un vaso de titulación pesar 3,16 [g] de esquelón de salmón molido y agregar agua desionizada hasta alcanzar los 50 [mL] de volumen total.
- Colocar el vaso en el equipo autotitulador con la termocupla y el agitador, medir la temperatura con agitación.
- Colocar el vaso de titulación dentro del baño de agua termorregulado a 50°C, sin dejar de agitar ni medir temperatura. (ver [Figura 16](#))
- Una vez que la temperatura medida esté cercana a los 50°C poner el electrodo dentro del vaso de titulación y medir pH en manual.
- Ajustar a pH 7,5 usando los gotarios de solución de NaOH.
- Una vez que se tenga un pH de 7,5 y temperatura de 50°C se comienza con el ensayo.

Ensayo de actividad

- Iniciar método desde el programa LabX; el método debe considerar valoración con NaOH, agitación y medición de temperatura, 10 minutos de duración y registro del volumen de NaOH agregado en el tiempo.
- Cuando comience el método agregar la solución de enzima previamente diluida (el volumen agregado no debe superar los 1000[μL]) y tapar.
- Una vez finalizado el método, quitar vaso de titulación y limpiar muy bien el agitador, termocupla y electrodo (electrodo solo con abundante agua desionizada).
- Recopilar datos registrados para posterior análisis según método de valoración de protón: pH-stato (presentado en el [ítem 3.5.1](#) de la sección de antecedentes).
- Realizar ensayo en duplicado.

Consideraciones para el ensayo

Es necesario repetir el ensayo con al menos 4 concentraciones distintas de proteasa para así construir la curva de actividad, que en este ensayo corresponde a la gráfica entre la velocidad inicial [mM/min] vs concentración de enzima [g/mL]. Además, es necesario realizar una autólisis, es decir, una hidrólisis igual a la descrita en el procedimiento del ensayo, pero sin adición de

enzima. Con esta autólisis se obtendrá el valor de la velocidad inicial cuando la concentración de enzima es cero.



Figura 16. Fotografía instalación experimental para el ensayo de actividad con esquelón de salmón.

- **Unidad de actividad proteolítica [Us] y actividad específica [Us/g]**

Se define la unidad de actividad proteolítica del ensayo de esquelón de salmón Us como la cantidad de proteasa que es responsable de catalizar la conversión de 1 μmol de producto por minuto de reacción bajo las condiciones señaladas en procedimiento paso a paso del ensayo actividad con esquelón de salmón (1% (m/v) de proteína, pH 7,5 e incubado a 50°C por 10 min).

Considerando esta definición, el valor de la actividad proteolítica específica en función de los gramos de preparado comercial de proteasas (unidades [Us/g enz]) se obtuvo calculando la pendiente de la curva de actividad en unidades [Us/mL ensayo] frente concentración de proteasa en unidades [g enz/mL ensayo]. Siempre verificando la linealidad de la curva obtenida. Donde la actividad en unidades [Us/mL ensayo] es equivalente al valor de la velocidad inicial (parámetro a) en unidades [mM/min] para cada ensayo realizado, según la equivalencia de unidades presentada a continuación.

$$a \left[\frac{\text{mmol}}{L_{\text{ensayo}} * \text{min}} \right] * 10^{-3} \left[\frac{L}{\text{mL}} \right] * 10^3 \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mmol}} \right] = a \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{mL}_{\text{ensayo}}} \right] = \left[\frac{Us}{\text{mL}_{\text{ensayo}}} \right] \quad (4.2.2)$$

El procedimiento realizado para obtener la velocidad inicial (parámetro a) de cada ensayo es el siguiente. Primero se calculó la concentración grupos α -amino liberados en el transcurso del ensayo mediante el método pH-stato (presentado en el ítem 3.5.1 de la sección de antecedentes) a partir de los datos recopilados de volumen de solución de NaOH 0,05N agregado en el tiempo. Con esto se construyó la curva de hidrólisis graficando la concentración de grupos α -amino liberados vs tiempo. Luego, se caracterizó la curva mediante una regresión no lineal, usando el modelo logarítmico (presentado en la ecuación (3.5.14) del ítem 3.5.4). Los parámetros a y b del

modelo se obtuvieron minimizando la suma de los errores cuadráticos entre los datos experimentales y los valores del modelo usando la herramienta Solver de Excel.

4.2.3. Evaluación del costo de las proteasas

Para otorgar una medida de comparación económica para las distintas proteasas, se calculó el costo en dólares por unidad de actividad proteolítica. Para esto se considera el precio por gramo de la proteasa (presentados en la sección de antecedentes, [Tabla 3](#)), dividido el valor de actividad específica obtenida en los ensayos de actividad con azocaseína y con esquelón de salmón, obteniendo el costo por unidad de actividad de cada proteasa en unidades [USD/10⁶U] y [USD//10⁶Us] respectivamente, como se muestra en la ecuación (4.2.3).

$$\text{Costo proteasa} \left[\frac{\text{USD}}{10^6 U} \right] = \frac{\text{Precio por gramo de proteasa} [\text{USD}/g]}{\text{Actividad específica} [U/g] * 10^{-6}} \quad (4.2.3)$$

4.3. Cálculo de la concentración de proteasa equivalente y dosis

Se utilizó la Alcalase 2,4L como proteasa de referencia para calcular la equivalencia de la concentración en unidades de actividad del ensayo de esquelón de salmón usando la siguiente ecuación (4.3.1).

$$E_0 \left[\frac{Us}{g_{esq}} \right] = E_0 \left[\frac{mAU}{g_{esq}} \right] * \frac{A_s (\text{alcalase}) [Us/g]}{\text{Actividad declarada (alcalase)} [mAU/g]} \quad (4.3.1)$$

Donde E_0 es la concentración de proteasa inicial en unidades de actividad y A_s corresponde al valor de actividad proteolítica específica obtenido con el ensayo de esquelón de salmón. Se usó la concentración proteolítica de referencia 13 [mAU/ g esquelón] de Alcalase 2,4L como la concentración máxima a evaluar, ya que un aumento de la concentración de la Alcalase 2,4L sobre dicho valor no supondría un aumento la eficiencia de la reacción (Valencia, et al., 2021).

La dosis de proteasa o cantidad de enzima que se debe agregar en cada experimento se calculó a partir de su concentración inicial y la actividad específica obtenida del ensayo con esquelón de salmón ($A_s(\text{proteasa})$) según la ecuación (4.3.2). Donde m_{proteasa} es la masa de proteasa en gramos y m_{esq} corresponde a la masa de esquelón de salmón utilizada.

$$m_{\text{proteasa}} = \frac{E_0 \left[\frac{Us}{g_{esq}} \right] * m_{\text{esq}} [g_{esq}]}{A_s(\text{proteasa}) \left[\frac{Us}{g} \right]} \quad (4.3.2)$$

Para obtener la dosis en volumen (aplicable a Alcalase 2,4L, Neutrase 0,8L y Flavourzyme 1000L) se dividió el valor de m_{proteasa} por su densidad.

4.4. Hidrólisis enzimática al 100% de subproducto

4.4.1. Diseño de experimentos

El trabajo experimental de evaluación de proteasas comerciales para la hidrólisis de esquelón de salmón contó con 13 experimentos, 4 proteasas evaluadas con 3 concentraciones de proteasa cada una, más un experimento de autólisis, cada uno de ellos es realizado en duplicado. El experimento de autólisis se realizó para evaluar si existen proteasas endógenas en el esquelón de salmón y si su efecto es significativo respecto a los experimentos con adición de proteasa. En la [Tabla 7](#) se muestran los experimentos, el código de identificación asignado, el cual hace referencia al nombre del preparado de proteasas utilizado y su concentración de proteasa. Las condiciones de reacción de los experimentos se presentan en la [Tabla 9](#).

Tabla 7. Diseño de experimentos hidrólisis al 100% subproducto. Elaboración propia.

Nº Exp	Código id	Proteasa	Concentración de proteasa equivalente [mAU/g esq] ¹
1	Alc-3	Alcalase 2,4FG	13,00
2	Alc-2	Alcalase 2,4FG	6,50
3	Alc-1	Alcalase 2,4FG	3,25
4	Neu-3	Neutrase 0,8L	13,00
5	Neu-2	Neutrase 0,8L	6,50
6	Neu-1	Neutrase 0,8L	3,25
7	Fla-3	Flavourzyme 1000L	13,00
8	Fla-2	Flavourzyme 1000L	6,50
9	Fla-1	Flavourzyme 1000L	3,25
10	Prota-3	Protamex	13,00
11	Prota-2	Protamex	6,50
12	Prota-1	Protamex	3,25
13	Auto	Sin adición	-

¹: Concentración de proteasa equivalente a [mAU/g esq] de Alcalase 2,4FG.

Tabla 8. Condiciones de reacción para experimentos de hidrólisis al 100% subproducto.

Condiciones para experimentos de hidrólisis	
Masa inicial esquelón	200 [g]
Volumen de reacción	200 [mL]
pH	Inicial nativo, sin control (pH nativo 6,5 app)
Temperatura	50 [°C]
Agitación	Agitador mediano, 400-600 RPM
Tiempo reacción	60 min
Muestreo	t= 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 [min] 500 [µL] de muestra inactivado en 500 [µL] de TCA 10% Centrifugar muestras inactivadas a 10.300RPM por 10[min]

4.4.2. Procedimiento

Soluciones y reactivos

- Agua desionizada
- TCA (ácido tricloroacético) al 10% (v/v)
- NaOH y HCL 6M
- Reactivo OPA (ver en Anexo E: Procedimiento Método OPA)

Procedimiento toma de muestras

- Preparar las puntas desechables de micropipeta de 1000[µL] cortando sus puntas de forma que la abertura quede más ancha.
- Preparar y etiquetar 10 tubos eppendorf con 500 [µL] de TCA al 10%
- Tomar muestra 500 [µL] de mezcla de reacción e inmediatamente llevar a tubo eppendorf con 500 [µL] de TCA y agitar en vortex para detener la reacción.
- Centrifugar por 10 min a 10.300RPM para separar las fases de la muestra.
- Recolectar el sobrenadante y depositar en tubos eppendorf vacíos y etiquetados.
- Congelar tubos con sobrenadante para posterior cuantificación de grupos alfa-amino por el método OPA.

Procedimiento hidrólisis

- Pesar 201[g] de esquelón se salmón molido en el reactor de vidrio y llevar a baño de agua a 50°C con agitación alta (550RPM), tapar e insertar termocupla para monitorear la temperatura en el reactor.
- Una vez se haya alcanzado 50°C dentro del reactor, se toma la muestra inicial (t=0).
- Agregar la dosis de proteasa correspondiente al experimento al mismo tiempo que se empieza a cronometrar la reacción.

- Transcurridos los primeros 10 min bajar la agitación (400RPM) para evitar salpicaduras, ya que disminuye la viscosidad de la mezcla. Mantener reactor tapado para evitar la evaporación del agua de la mezcla.
- Transcurridos los 60 min de reacción y habiendo recolectado la última muestra (t=60 min) se procede a la separación de fases.

Procedimiento separación de fases

- Trasvasiar el contenido del reactor a una botella con tapa adecuada para usarse en la centrífuga refrigerada y previamente tarada.
- Centrifugar a 8.000 RPM por 10 min a 20°C
- Trasvasiar a embudo de decantación, la fase insoluble quedará en la botella. Pesar la botella con fase insoluble.
- Separar la fase soluble acuosa de la fase aceite usando el embudo de decantación y vasos precipitados tarados. Pesar ambas fases.
- Tomar una muestra de 1.000 [μL] de la fase soluble acuosa, depositar en tubo eppendorf etiquetado como “H. Tot” y congelar para posterior realización de hidrólisis total.

4.4.3. Obtención de parámetros de caracterización de la hidrólisis

- **Fracción soluble**

La fracción soluble (FS) se define como la razón entre la masa obtenida de fracción soluble (f.s.) y la masa total de la mezcla al finalizar la hidrólisis (m_T) expresada en porcentaje, tal como se muestra en la ecuación (4.4.1).

$$FS = \frac{f.s.}{m_T} * 100\% \quad (4.4.1)$$

En la [Figura 17](#) se muestra una fotografía del hidrolizado resultante luego de la centrífuga, en este se logra observar 3 fases distintas, una fase de aceite (f.a.), otra fase soluble acuosa (f.s.), y una fase insoluble (f.i.). La fase de aceite corresponde únicamente al aceite contenido en los esquelones de salmón y el cual no ha sido transformado con la hidrólisis. La fase soluble acuosa corresponde al hidrolizado propiamente tal, es decir, en esta fase contiene los productos de reacción, que son péptidos, agua y proteínas solubles parcialmente hidrolizadas. La tercera fase está compuesta principalmente de huesos y proteínas insolubles no hidrolizadas.

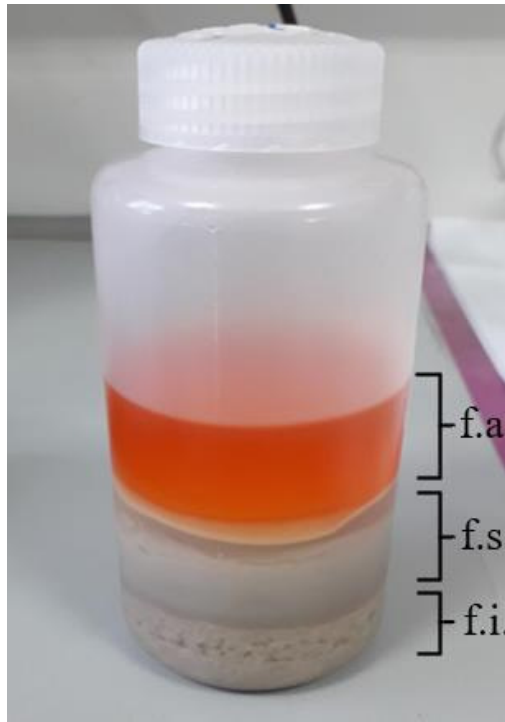


Figura 17. Distinción fases aceite, soluble e insoluble del hidrolizado de salmón resultante luego de la centrifuga (8000RPM por 10 min), donde f.a. es la fase aceite, f.s. es la fase soluble y f.i. es la fase insoluble.

- **Recuperación de nitrógeno (RN)**

La recuperación de nitrógeno se define como la razón porcentual entre el nitrógeno presente en la fase soluble del hidrolizado obtenido y el nitrógeno total presente en el sustrato (nitrógeno total del esquelón de salmón).

El nitrógeno total contenido por gramo de esquelón de salmón se obtuvo a partir del del análisis de composición por el método Kjeldahl (ver [Tabla 5](#)). Luego, se calcula el nitrógeno total según la ecuación (4.4.2), donde m_T es la masa total de la mezcla al finalizar la hidrólisis.

$$\text{masa de N total en esquelón} = m_T [g_e] * 0,1583 \left[\frac{g_p}{g_e} \right] * \frac{1}{6,25} \left[\frac{g_N}{g_p} \right] \quad (4.4.2)$$

La determinación del nitrógeno presente en la fase soluble del hidrolizado se realizó mediante una hidrólisis total y posterior cuantificación de grupos alfa amino libres por el método OPA. La hidrólisis total se realizó a una muestra de la fracción soluble obtenida a los 60 min de hidrólisis. En una hidrólisis total, cuando todos los enlaces peptídicos se encuentran rotos, la cantidad de grupos alfa amino libres es igual a la cantidad de nitrógeno presente, entonces el nitrógeno total contenido en la fase soluble se obtiene según la ecuación (4.4.3).

$$\text{masa de N en f.soluble} = C_{(H.total)} \left[\frac{mmol}{L} \right] * 14 \left[\frac{g_N}{mol_N} \right] * V_{F.S.} [L] * 10^{-3} \quad (4.4.3)$$

Donde $C_{(H.total)}$ corresponde a la concentración de grupos alfa amino libres de la fase soluble totalmente hidrolizada y $V_{F.S.}$ al volumen de fracción soluble del hidrolizado obtenido para el respectivo experimento. Entonces la recuperación de nitrógeno se calcula como se muestra en la ecuación (4.4.4).

$$RN = \frac{14 * 10^{-3} * C_{(H.total)} * V_{F.S.}}{m_T * 0,1583 * \frac{1}{6,25}} * 100\% \quad (4.4.4)$$

Los procedimientos se encuentran descritos en detalle en el [Anexo D: Procedimiento Hidrólisis Total](#) y en el [Anexo E: Procedimiento Método OPA](#).

- **Grupos alfa amino liberados [mM]: método OPA**

Como se explica en la sección de antecedentes, [ítem 3.5.1](#), la cantidad de péptidos formados durante la hidrólisis se determina a través de la cuantificación de los grupos α -amino libres presentes en la fase soluble del hidrolizado, ya que cantidad de grupos alfa amino liberados será equivalente a la cantidad de enlaces peptídicos rotos producto de la hidrólisis. La concentración de grupos alfa amino liberados en determinado tiempo de la reacción ($C_{(t)}$) se calculó como la resta entre la concentración de grupos alfa amino libres presentes en t y en t=0, tal como se muestra en la ecuación (4.4.5).

$$C_{(t)}[mM] = (C. \text{ alfa amino libres}_t) - (C. \text{ alfa amino libres}_{t=0}) \quad (4.4.5)$$

La cuantificación de la concentración de los grupos alfa amino libres se realizó mediante el método OPA usando serina como estándar, cuyo procedimiento se encuentra en el [Anexo E: Procedimiento Método OPA](#).

- **Grado de hidrólisis (GH)**

El grado de hidrólisis se define según la ecuación (4.4.6), previamente comentada en la sección de antecedentes, [ítem 3.5.2](#).

$$GH = \frac{h}{h_{tot}} * 100\% \quad (4.4.6)$$

Al tratarse de hidrólisis de un material heterogéneo como lo es el esquelón de salmón, que contiene huesos, no es posible cuantificar los enlaces peptídicos grupos alfa amino del esquelón de salmón original (h_{tot}), por lo cual se realiza una estimación de este valor a partir del nitrógeno total contenido en el esquelón de salmón. El valor de h_{tot} fué estimado según la expresión (4.4.7), en la cual se considera el total de nitrógeno del subproducto menos el nitrógeno que inicialmente se encuentra formando grupos alfa amino libres.

$$h_{tot} = \left(\frac{\text{Cantidad N por } g_e [mmol N/g_e]}{\text{Fracción másica prot } [g_p/g_e]} \right) - \left(\frac{C. \text{ alfa amino libres}_{t=0} [mM] * V_{F.S.} [L]}{m_{proteína} [g]} \right) \quad (4.4.7)$$

Luego se tiene:

$$\text{Cantidad de N por } g_e = 0,1583 \left[\frac{g_p}{g_e} \right] * \frac{1}{6,25} \left[\frac{g_N}{g_p} \right] * \frac{1}{14} \left[\frac{\text{mol N}}{g_N} \right] * 10^3 \left[\frac{\text{mmol}}{\text{mol}} \right] \quad (4.4.8)$$

$$\text{Cantidad de N por } g_e = 1,81 \left[\frac{\text{mmol N}}{g_e} \right]$$

$$\frac{\text{Cantidad de N por } g_e}{\text{Fracción másica proteína}} = 1,81 \left[\frac{\text{mmol N}}{g_e} \right] * \frac{1}{0,1583} \left[\frac{g_e}{g_p} \right] = 11,428 \left[\frac{\text{mmol N}}{g_p} \right] \quad (4.4.9)$$

Así los enlaces peptídicos totales por gramo de proteína se estimaron a partir de la siguiente expresión

$$h_{tot} = \left(11,428 - \left(\frac{C_{\text{alfa amino libres}}_{t=0} * V_{F.S.}}{m_T * 0,1583} \right) \right) \left[\frac{\text{mmol e. pept.}}{g_p} \right] \quad (4.4.10)$$

Los enlaces peptídicos rotos producto de la hidrólisis (h) se estimaron a partir de la concentración de enlaces peptídicos liberados a los 60 min de reacción ($C_{(t=60)}$) según la ecuación (4.4.11).

$$h_{(t=60)} = \frac{C_{(t=60)} * V_{F.S.}}{m_T * 0,1583} \left[\frac{\text{mmol e. pept.}}{g_p} \right] \quad (4.4.11)$$

Esto corresponde a una subestimación del valor de $h_{(t=60)}$, ya que no se consideran las proteínas insolubles parcialmente hidrolizadas contenidas en la fracción insoluble del hidrolizado obtenido. Entonces, el GH calculado según el procedimiento descrito corresponde a una subestimación.

- **Curvas de hidrólisis y ajuste de parámetros del modelo logarítmico**

La obtención de las curvas de hidrólisis se realizó a partir de los datos de concentración de grupos alfa amino libres de las muestras, obtenidos por el método OPA. Para esto, se grafica la concentración de grupos alfa amino liberados ($C_{(t)}$) en función del tiempo de reacción (t).

Para ajustar el modelo logarítmico a las curvas experimentales, se minimiza la suma de los errores cuadráticos (SS_E) variando los valores de los parámetros a y b del modelo con la herramienta Solver de Excel. La suma de los errores cuadráticos a minimizar se expresa según la ecuación (4.4.12), donde P_t^* corresponde a la concentración de grupos alfa amino liberados ($C_{(t)}$) obtenida experimentalmente para cierto tiempo t y P_t es el valor predicho por el modelo para dicho tiempo t , calculado según la ecuación (4.4.13) (presentado en detalle en sección de antecedentes, ítem 3.5.4).

$$SS_E = \sum (P_t^* - P_t)^2 \quad (4.4.12)$$

$$P_t = \frac{1}{b} \ln(abt + 1) \quad (4.4.13)$$

El error estándar o error de estimación de los parámetros obtenidos se calculó según las ecuaciones a continuación ((4.4.14), (4.4.15)).

$$Error\ estándar = \sqrt{\sigma^2 C_{jj}} \quad (4.4.14)$$

$$\sigma^2 = MSE = \frac{SS_E}{n - p} \quad (4.4.15)$$

Donde C_{jj} corresponde al valor diagonal de la matriz de dispersión $(X'X)^{-1}$, MSE es el error cuadrático medio, $(n - p)$ es el grado de libertad de la regresión, con n el número de datos y p el número de parámetros.

Para asegurar la calidad el modelo ajustado obtenido en cada uno de los experimentos, se calculó el coeficiente de determinación ajustado y se realizó una prueba de significancia de los parámetros estimados.

Coeficiente de determinación (R^2)

El coeficiente de determinación nos indica la calidad del modelo ajustado en un rango del 0 al 1, donde es deseable obtener un valor bien cercano a 1. Sin embargo, el obtener valores más altos de R^2 no siempre implica un mejor ajuste, ya que puede existir una sobre parametrización del modelo lo cual hace disminuir el coeficiente de determinación, pero podemos estar incorporando parámetros no significativos. Para evitar esta interpretación errónea se utilizó el coeficiente de determinación ajustado ($R_{ajustado}^2$), el cual no cambia si se agregan variables del modelo. Esto se calculó según las siguientes ecuaciones:

$$R_{ajustado}^2 = 1 - \frac{n - 1}{n - p} (1 - R^2) \quad (4.4.16)$$

$$R^2 = \frac{SS_R}{SS_T} = 1 - \frac{SS_E}{SS_T} \quad (4.4.17)$$

Donde:

$$SS_T = SS_R + SS_E \quad (4.4.18)$$

$$SS_T = \sum (P_t - \bar{P})^2 \quad (4.4.19)$$

Con P_t = Valor del modelo ajustado a los datos experimentales para cierto tiempo t , y $\bar{P}$ = Valor promedio de datos experimentales.

Prueba de significancia del parámetro

Para determinar si los parámetros (β_i) del modelo logarítmico son significativos para la predicción del modelo y evitar una posible sobre parametrización, se realizó una prueba de significancia del parámetro. Esta prueba se basa en la hipótesis:

$$H_0: \beta_i = 0 \quad (4.4.20)$$

$$H_1: \beta_i \neq 0 \quad (4.4.21)$$

Y la prueba estadística t que se utiliza corresponde al parámetro dividido su error estándar asociado, tal como se muestra en la ecuación (4.4.22).

$$t_0 = \frac{\beta_i}{\sqrt{\sigma^2 C_{jj}}} \quad (4.4.22)$$

Luego que tiene que:

- La hipótesis nula (H_0) se rechaza si se cumple que $t_0 > t_{\left(\frac{\alpha}{2}; (n-p)\right)}$, entonces se concluye que el parámetro β_i es significativo.
- La hipótesis nula (H_0) no se rechaza si se cumple que $t_0 < t_{\left(\frac{\alpha}{2}; (n-p)\right)}$, entonces se concluye que el parámetro β_i no es significativo y se puede eliminar del modelo.

- **Susceptibilidad proteolítica (SP)**

La susceptibilidad proteolítica nos permite evaluar cuantitativamente la eficiencia de una proteasa en la hidrólisis de una fuente de proteína, la cual es esquelón de salmón. Además, permite evaluar la estabilidad y flexibilidad de las proteínas contenidas en dicha fuente y su accesibilidad a la enzima que se evalúa (Valencia, et al., 2019).

La susceptibilidad proteolítica (SP) se obtuvo a partir de los parámetros a y b del modelo logarítmico ajustado para cada experimento según la ecuación (4.4.23).

$$SP = \frac{a}{b} \quad (4.4.23)$$

También se evaluó la susceptibilidad proteolítica específica respecto a la enzima (SPE_e) para determinar el atributo asociado a la proteasa independiente de la concentración enzimática y comparar entre las proteasas evaluadas. La SPE_e corresponde a la pendiente de la gráfica SP frente a la concentración de proteasa en unidades de actividad [Us/g esq].

4.4.4. Evaluación del costo de proteasa- rendimiento

En la evaluación del costo de la proteasa- rendimiento de la hidrólisis se usó la cantidad de nitrógeno recuperado a la fase soluble, calculada según la ecuación (4.4.3), como indicador de rendimiento ya que corresponde a una medida de aprovechamiento del subproducto hidrolizado y es aplicable a procesos productivos de hidrolizados comerciales.

Para el cálculo del indicador de costo- rendimiento se divide el costo en proteasa del experimento por la masa de nitrógeno recuperado obtenida, tal como se muestra en la ecuación (4.4.24), donde el costo de la proteasa se calcula multiplicando el costo de la proteasa por gramo y los gramos de proteasa utilizados para el experimento en cuestión.

$$\text{costo proteasa} - \text{rendimiento} = \frac{m_{\text{proteasa}} * \text{Precio proteasa} \left[\frac{\text{USD}}{\text{kg}_N} \right]}{C_{(H.\text{total})} * 14 * V_{F.S.} * 10^{-3}} \quad (4.4.24)$$

4.5. Análisis estadísticos de los resultados

Todas las correlaciones lineales presentadas en el presente trabajo fueron analizadas mediante la prueba estadística de correlación lineal significativa, para lo cual se calcula el t_R a partir del coeficiente de correlación R y el número de observaciones (n), según la ecuación (4.5.1). Luego este valor se compara con el valor t tabulado con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

$$t_R = (R) * \frac{\sqrt{(n - 2)}}{\sqrt{(1 - R^2)}} \quad (4.5.1)$$

Los resultados de concentración de grupos α - amino liberados final ($C_{t=60}$), velocidad inicial (parámetro a), susceptibilidad proteolítica (SP), fracción soluble (FS), recuperación de nitrógeno RN y costo proteasa-rendimiento hidrólisis, se analizaron estadísticamente realizando un ANOVA con nivel de significancia $p < 0,05$ para determinar las diferencias significativas entre proteasas a una misma concentración de proteasa, y otro ANOVA ($p < 0,05$) para determinar diferencias significativas entre las tres concentraciones proteolíticas de una misma proteasa. Adicionalmente se realizó la prueba estadística de Tukey o prueba de diferencia honesta (HDS) con un nivel de significancia de $p < 0,05$ para evaluar las diferencias significativas individuales entre los parámetros de caracterización de los experimentos.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de las proteasas comerciales

En la [Figura 18](#) se muestran los gráficos obtenidos a partir de los resultados de los ensayos de actividad de azocaseína, los cuales corresponden a las curvas de calibración de cada sistema enzima-sustrato ensayado. Se verificó la linealidad de los sistemas enzima sustratos ensayados ($p=0,05$); Alcalase – azocaseína (1%) a concentración máxima de 0,053 [mg enz/mL ensayo]; Neutrase – azocaseína (1%) a concentración máxima de 0,460 [mg enz/mL ensayo], Flavourzyme – azocaseína (1%) a concentración máxima de 0,462 [mg enz/mL ensayo]; y Protamex – azocaseína (1%) a concentración máxima de 0,182 [mg enz/mL ensayo]. Las regresiones lineales obtenidas para cada sistema enzima – sustrato se presentan en cada gráfico de la [Figura 18](#). La pendiente de la regresión lineal obtenida corresponde a la actividad proteolítica específica de cada preparado comercial de proteasas.

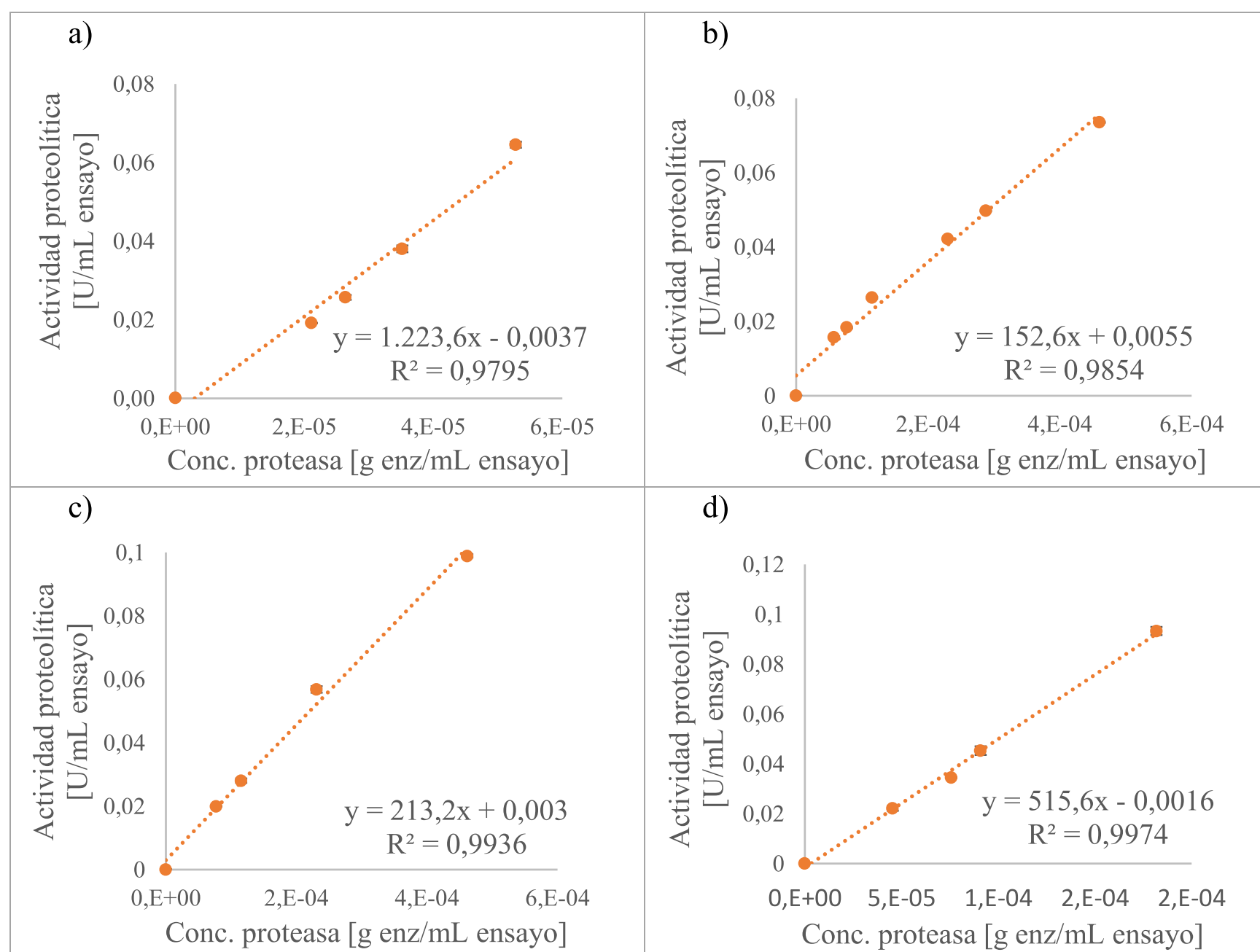


Figura 18. Curvas de actividad proteolítica obtenidas a partir del ensayo con Azocaseína de: a)Alcalase 2,4L, b)Neutrase 0,8L, c)Flavourzyme 1000L y d) Protamex. Condiciones del ensayo: 10 min incubación a 50°C en sustrato de azocaseína al 1% en solución tampón sodio fosfato (50mM, pH 7,5), cuantificación por espectrofotometría (440nm). Elaboración propia.

De los ensayos con esquelón de salmón (1% proteína) como sustrato se obtienen las curvas de hidrólisis que se presentan en la [Figura 19](#) a través del método del pH-stato (presentado en [ítem 3.5.1](#)). En color negro se presenta en ensayo de control, en el cual se representa la autólisis del esquelón de salmón, confirmando la presencia de actividad de enzimas endógenas del subproducto. Se observa que las curvas de hidrólisis, a pesar de realizarse a bajas concentraciones y en corto tiempo de ensayo, no siguen un comportamiento lineal en el transcurso de los 10 min de ensayo. Entonces, con estos datos experimentales se realizó el ajuste del modelo logarítmico presentado anteriormente en la ecuación (4.4.13) del [ítem 4.4.3](#), obteniéndose un excelente ajuste de los parámetros a y b , lo cual se muestra en la [Tabla 8](#).

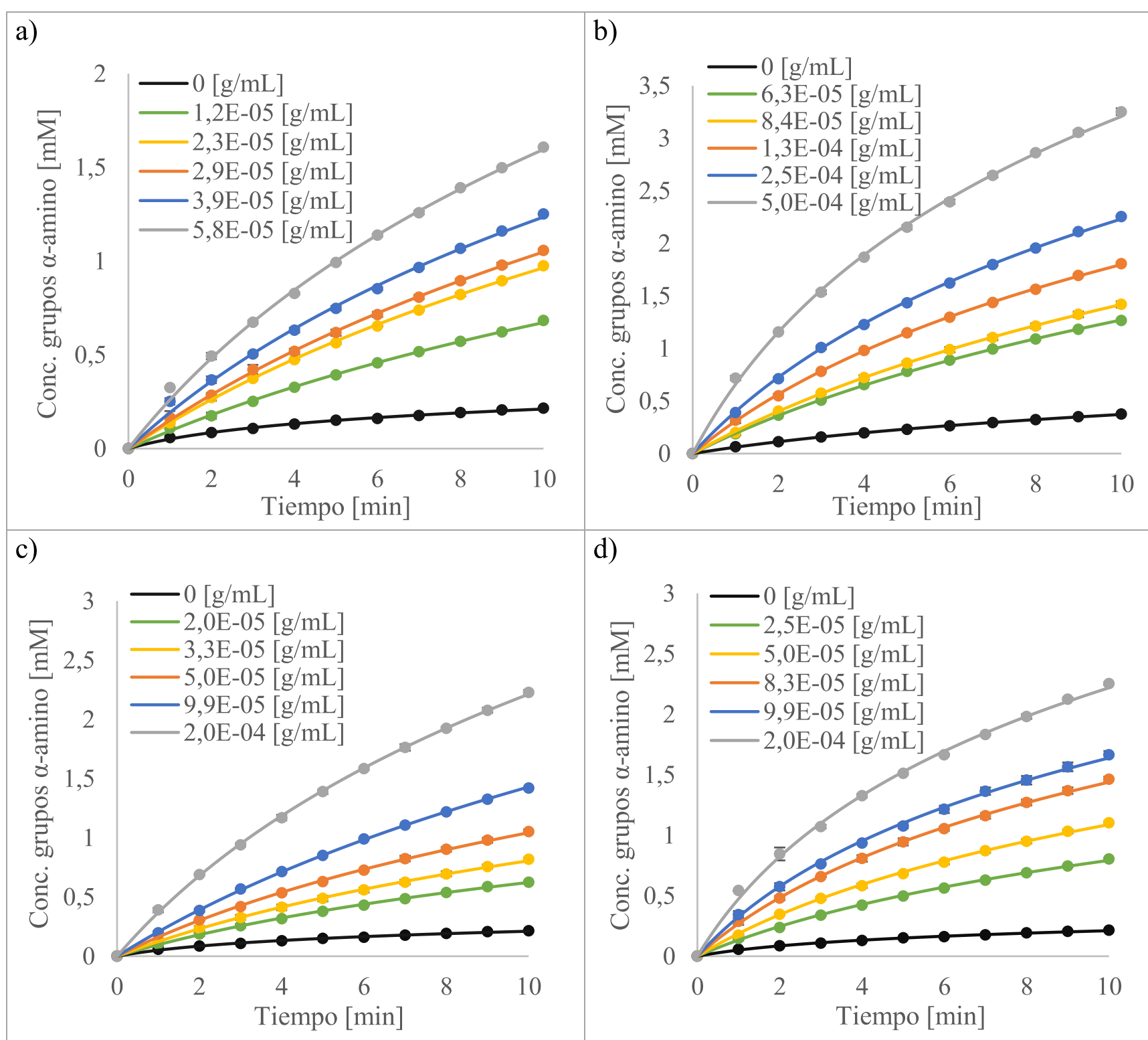


Figura 19. Curvas de hidrólisis obtenidas de los ensayos de actividad con esquelón de salmón con distintas proteasas: a)Alcalase 2,4L, b)Neutrase 0,8L, c)Flavourzyme 1000L y d) Protamex. Condiciones del ensayo: 10 min incubación a 50°C en sustrato de esquelón de salmón molido (1% proteína), pH 7,5, cuantificación por valoración con NaOH 0,05N en pH-stato. En viñeta se muestra punto experimental representativo, en línea continua se muestra el modelo logarítmico ajustado. Elaboración propia.

Considerando que la actividad enzimática global corresponde a la velocidad inicial de reacción, cuando la presencia de productos aun no afecta a dicha velocidad, se tiene que la actividad corresponde a el límite dP/dt cuando $t \rightarrow 0$, donde P es el producto de la reacción (Scopes , 2002). En el ítem 3.5.4, de antecedentes, se presenta el cálculo del dicho límite considerando el modelo logarítmico, obteniéndose que dicho limite es igual al valor del parámetro a del modelo logarítmico (Ec. (3.5.17)). Luego se tiene que el valor del parámetro a ajustado corresponde a la velocidad inicial de reacción y, por ende, a la actividad enzimática de cada ensayo.

Tabla 8. Parámetros ajustados del modelo logarítmico obtenidos para los ensayos de actividad con esquelón de salmón. Elaboración propia.

Proteasa	Conc. de proteasa [g/mL ensayo]	Parámetro a [mM/min]	Parámetro b [1/mM]	R ²
Alcalase 2,4L	1,16 E-05	0,099	1,088	0,997
	2,32 E-05	0,146	0,803	0,998
	2,90 E-05	0,160	0,759	0,999
	3,86 E-05	0,207	0,773	0,998
	5,78 E-05	0,284	0,664	0,998
Neutrase 0,8L	6,32 E-05	0,206	0,707	1,000
	8,41 E-05	0,229	0,628	1,000
	1,26 E-04	0,341	0,650	0,999
	2,51 E-04	0,449	0,567	0,999
	4,97 E-04	0,778	0,490	0,999
Flavourzyme 1000L	2,00 E-05	0,104	1,5377	0,999
	3,32 E-05	0,133	1,1510	0,998
	4,98 E-05	0,174	0,9107	0,998
	9,90 E-05	0,218	0,5547	1,000
	1,96 E-04	0,405	0,5002	0,999
Protamex	2,49 E-05	0,1477	1,4361	0,997
	4,98 E-05	0,2078	1,0836	0,997
	8,27 E-05	0,3065	0,9454	0,996
	9,90 E-05	0,3795	0,9127	0,997
	1,96 E-04	0,5684	0,7469	0,997
Autólisis	0	0,0649	9,1982	0,999

De los resultados presentados en la Figura 19 y Tabla 8, se puede observar que en el control se obtuvo una velocidad inicial (parámetro a) no despreciable en comparación con las velocidades iniciales de los ensayos con adición de enzima. Para cuantificar la actividad de las proteasas evaluadas evitando cuantificar la actividad de las enzimas endógenas del esquelón de salmón, se calcula la actividad restando la velocidad obtenida en el control a la velocidad obtenida en el ensayo correspondiente, como se muestra en la ecuación (5.1.1).

$$Actividad_{ensayo} \left[\frac{Us}{mL \ ensayo} \right] = a_{ensayo} - a_{control} \left[\frac{mM}{min} \right] \quad (5.1.1)$$

Con la actividad proteolítica de cada ensayo calculado en unidades [Us/mL ensayo] se procedió a construir la curva de actividad de cada proteasa, graficando la actividad en función de la concentración de proteasa [g enz/mL ensayo], lo cual se muestra en la [Figura 20](#).

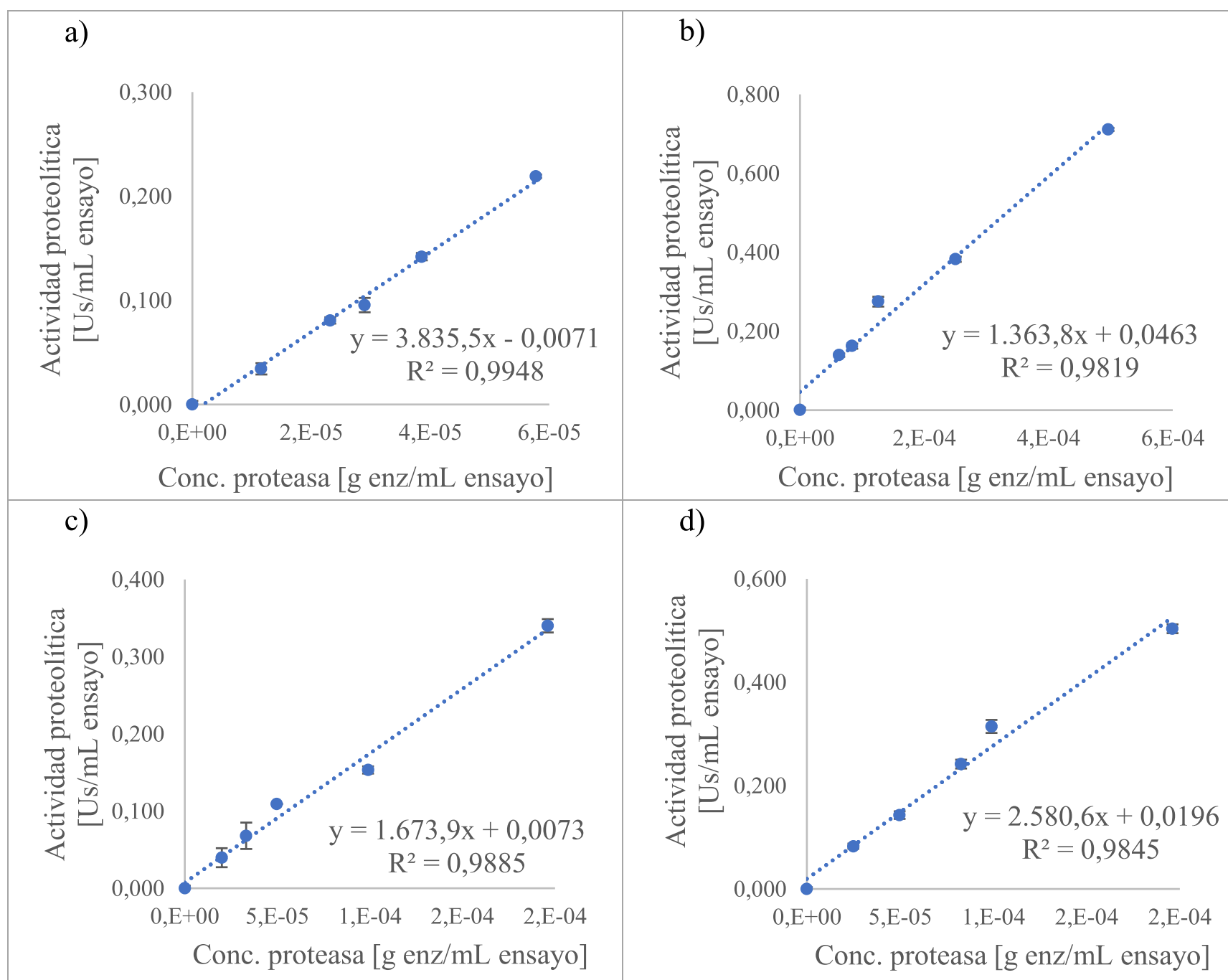


Figura 20. Curvas de actividad proteolítica de: a)Alcalase 2,4L, b)Neutrase 0,8L, c)Flavourzyme 1000L y d) Protamex obtenidas a partir del ensayo on esquelón de salmón. Condiciones del ensayo: 10 min incubación a 50°C en sustrato de esquelón de salmón molido (1% proteína), pH 7,5, cuantificación por valoración con NaOH 0,05N en pH-stato. Elaboración propia.

Se verificó la linealidad para los sistemas enzima – sustrato de la [Figura 20](#) ($p=0,05$); Alcalase – esquelón de salmón (1% proteína) a concentración máxima de 0,058 [mg enz/mL ensayo]; Neutrase – esquelón de salmón (1% proteína) a concentración máxima de 0,497 [mg enz/mL ensayo]; Flavourzyme – esquelón de salmón (1% proteína) a concentración máxima de 0,462 [mg enz/mL ensayo]; y Protamex – esquelón de salmón (1% proteína) a concentración máxima de 0,196 [mg enz/mL ensayo]. Además, las correlaciones entre la actividad proteolítica del ensayo con esquelón [Us/mL] y la concentración de proteasa [g/mL ensayo] (presentadas cada gráfico de

la [Figura 20](#)) son de excelente calidad ($tr>14,7$; $t=3,18$), lo cual valida el ensayo de actividad con esquelón de salmón como método analítico para la determinación de actividad proteolítica en el sustrato de esquelón de salmón.

De las curvas de actividad presentadas en la [Figura 18](#) y la [Figura 20](#) se observa que la sensibilidad de los ensayos, que corresponde a la pendiente de cada gráfico, es mayor para la Alcalase que para las otras proteasas en los dos ensayos realizados. También se puede observar que los valores de sensibilidad del ensayo con esquelón de salmón son mayores que los obtenidos del ensayo con azocaseína en las 4 proteasas evaluadas, lo cual puede representar una ventaja sobre el ensayo con azocaseína si se desea cuantificar diferencias pequeñas de actividad enzimática.

En la [Tabla 9](#) se presenta un resumen de los valores de actividad proteolítica específica obtenidos, en unidades [U/g enz] para actividad obtenida a partir del ensayo de azocaseína y en unidades [Us/g enz] para actividad obtenida a partir del ensayo con esquelón de salmón.

Tabla 9. Resultados de actividad proteolítica específica de los ensayos con azocaseína y de los ensayos con esquelón de salmón. Elaboración y datos propios.

Proteasa	Ensayo con azocaseína ¹		Ensayo con esquelón de salmón ²	
	Actividad [U/g enz]	R ²	Actividad [Us/ g enz]	R ²
Alcalase 2,4L	1.223,6	0,980	3.835,5	0,995
Protamex	515,6	0,997	2.580,6	0,985
Flavourzyme 1000L	213,2	0,994	1.673,9	0,989
Neutrase 0,8L	152,6	0,985	1.363,8	0,982

¹: 10 min incubación a 50°C en sustrato de azocaseína al 1% en solución tampón sodio fosfato (50mM, pH 7,5), cuantificación por espectrofotometría a 440nm.
²: 10 min incubación a 50°C en sustrato de esquelón de salmón (1% proteína), pH 7,5, cuantificación por valoración con NaOH 0,05N.

Al ordenar las proteasas de mayor a menor valor de actividad específica, notamos que para ambos ensayos se obtuvo el mismo posicionamiento. La proteasa que presentó una mayor actividad proteolítica específica es la Alcalase 2,4L, con valores de 1.224 [U/g enz] y 3.836[Us/g enz], seguido de la Protamex, la Flavourzyme 1000L y finalmente la Neutrase 0,8L.

Se evaluó si existía correlación entre los ensayos realizando un diagrama de correlación entre las unidades de actividad proteolítica de cada ensayo por volumen de reacción ya que los ensayos fueron realizados en un distinto volumen de reacción (1,1 mL en ensayo con azocaseína y 50mL aprox. en ensayo con esquelón). De esto se obtuvo que efectivamente existe correlación lineal positiva entre los dos ensayos ($p<0,05$) de buena calidad ($tr>19,4$; $t=4,30$), presentando valores de R² sobre 0,990, lo cual se presenta en la [Figura 21](#).

Con las correlaciones presentadas en la [Figura 21](#) es posible determinar la actividad en unidades del ensayo con esquelón de salmón [Us/mL ensayo] a partir del valor de actividad obtenido con el ensayo con azocaseína en unidades [U/mL ensayo] y viceversa. Lo cual podría resultar conveniente para futuros estudios, ya que el ensayo con azocaseína es más rápido y sencillo de ejecutar y requiere de menor cantidad de proteasa al realizarse en un volumen de reacción mucho menor.

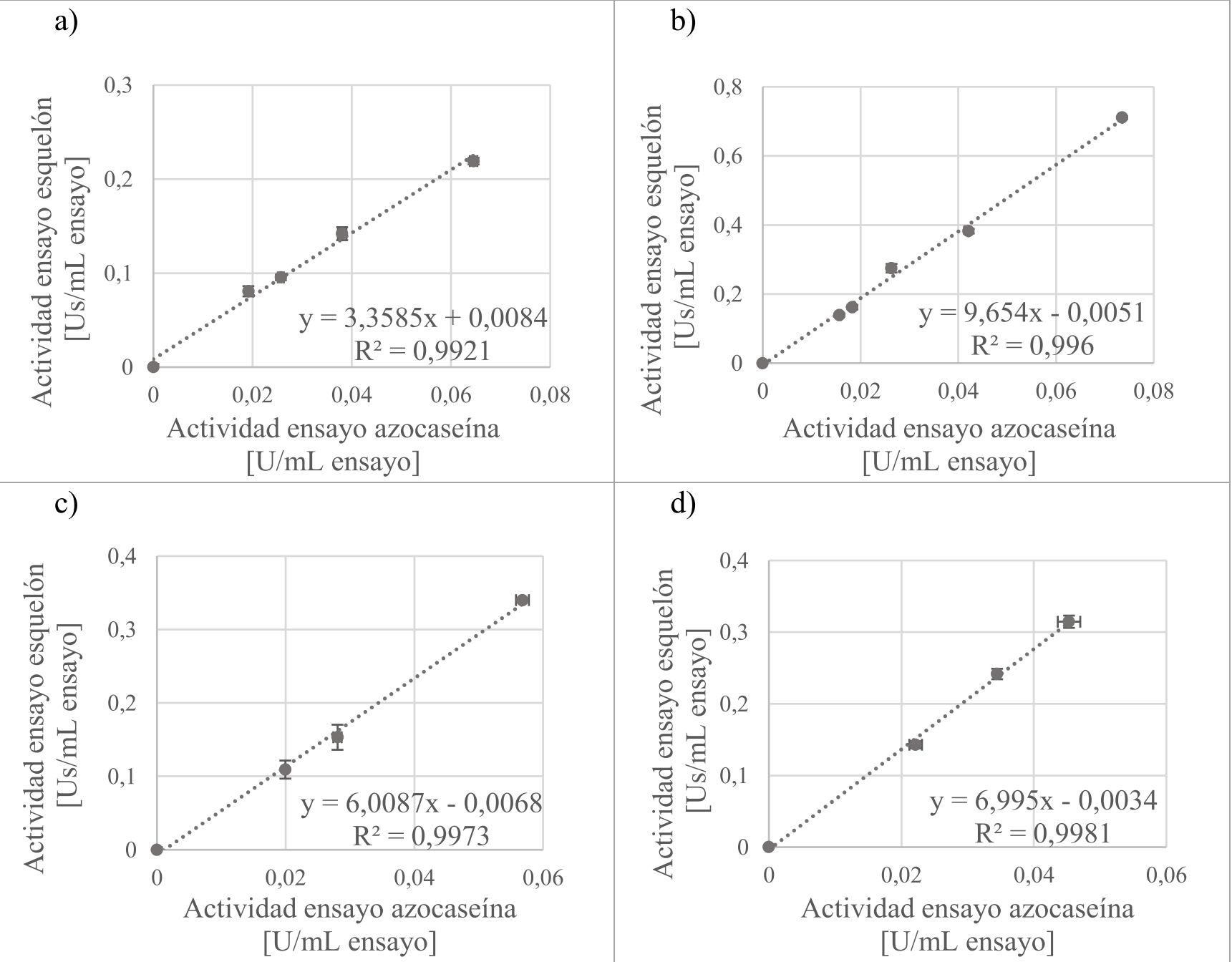


Figura 21. Gráficos de correlación entre ensayos de actividad proteolítica con azocaseína y con esquelón de salmón para las proteasas: a)Alcalase 2,4L, b)Neutrase 0,8L, c)Flavourzyme 1000L y d) Protamex. Condiciones del ensayo con azocaseína: 10 min incubación a 50°C en sustrato de azocaseína al 1% en solución tampón sodio fosfato (50mM, pH 7,5), cuantificación por espectrofotometría (440nm). Condiciones del ensayo con esquelón de salmón: 10 min incubación a 50°C en sustrato de esquelón de salmón molido (1% proteína), pH 7,5, cuantificación por valoración con NaOH 0,05N en pH-stato. Elaboración propia

5.2. Cálculo de la concentración de proteasa equivalente y dosis

De los ensayos de actividad con esquelón de salmón se obtuvo una actividad proteolítica específica de 3.835,6 [Us/g enzima] para la Alcalase 2,4L. Aplicando esto a la ecuación (4.3.1) (presentada

en ítem 4.3) se obtiene que la concentración de enzima inicial (E_0) equivalente a 13,00[mAU/g esq] de Alcalase 2,4L es 20,8[Us/g esquelón], tal como se muestra en la ecuación (5.2.1).

$$E_0 \left[\frac{Us}{g_{esq}} \right] = 13,00 \left[\frac{mAU}{g_{esq}} \right] * \frac{3.835,6 \left[\frac{Us}{g} \right]}{2.400 \left[\frac{mAU}{g} \right]} = 20,8 \left[\frac{Us}{g_{esq}} \right] \tag{5.2.1}$$

De la misma forma se obtuvieron las concentraciones de proteasa 10,4 y 5,2 [Us/g esquelón] equivalentes a 6,5 y 3,25 [mAU/g esquelón] de Alcalase 2,4FG respectivamente. Luego, a partir de las concentraciones de proteasa equivalentes se procedió a calcular la dosis del preparado comercial de proteasa (en gramos) que es necesaria añadir a cada experimento según la ecuación (4.3.2) (presentada en ítem 4.3). La concentración de proteasa de cada experimento y la dosis de preparado de proteasa añadida se presentan en la [Tabla 10](#).

Tabla 10. Concentración de proteasa y dosis a añadir a los experimentos de hidrólisis al 100% de subproducto.
Elaboración propia.

Nº Exp	Código id	Concentración de proteasa [Us/g esq]	Dosis de preparado de proteasa [g]
1	Alc-3	20,8	1,08
2	Alc-2	10,4	0,54
3	Alc-1	5,2	0,27
4	Neu-3	20,8	3,05
5	Neu-2	10,4	1,52
6	Neu-1	5,2	0,76
7	Fla-3	20,8	2,48
8	Fla-2	10,4	1,24
9	Fla-1	5,2	0,62
10	Prota-3	20,8	1,61
11	Prota-2	10,4	0,80
12	Prota-1	5,2	0,40
13	Auto	-	-

5.3. Hidrólisis enzimática al 100% subproducto

5.3.1. Curvas de hidrólisis

Las concentraciones obtenidas de grupos α -amino liberados en el transcurso de la hidrólisis (C_t) fueron graficadas en función del tiempo de reacción y agrupadas por la proteasa evaluada, lo cual se muestra en [Figura 22](#). Las curvas de hidrólisis obtenidas corresponden a las curvas de hidrólisis enzimática típicas descritas por diversos autores, caracterizadas por una fase inicial

rápida, seguido de una fase lenta (Kristinsson & Rasco, 2000 a; Valencia, et al., 2014; Qi & He, 2006). En los gráficos también se muestra el experimento de control, que corresponde a la autólisis del subproducto.

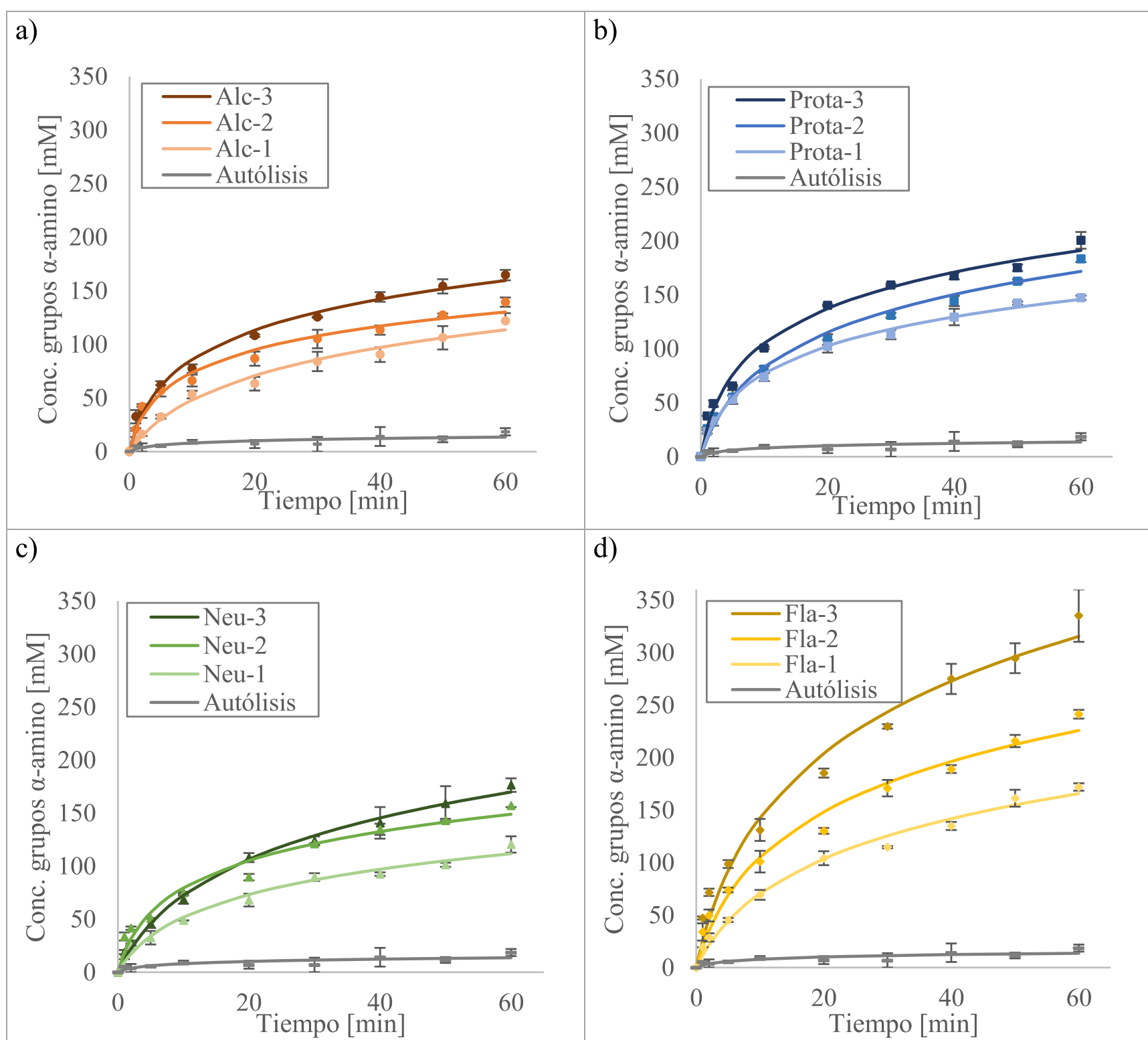


Figura 22. Curvas de hidrólisis de esquelón de salmón molido al 100%, 50°C, pH nativo y sin control a concentraciones de 5,2, 10,4 y 20,8 [Us/g esq] de a) Alcalase 2,4L, b) Protamex, c) Neutrase0,8L y d) Flavourzyme 1000L. En viñeta los datos experimentales con sus barras de error y en líneas continuas se presenta el valor del modelo ajustado. Elaboración propia.

En el experimento de control (autólisis) se obtuvo una concentración de grupos α -amino final de apenas 18,5 [mM] (GH 0,06%), mientras que para los experimentos con adición de proteasa se obtiene entre 120-340[mM] (GH 1,4-6,1%). Estos resultados confirman la presencia de autólisis en el esquelón de salmón al 100%, sin embargo, al compararlos con los experimentos de hidrólisis con adición de proteasa, se tiene que su efecto es insignificante. En el trabajo de Aspevik et al (2016) igualmente se evalúa la autólisis de subproductos de salmón (cabeza y esquelón), con adición de agua 1:1, obteniendo un GH menor a 0,5% al cabo de 120 minutos de reacción (50°C,

pH 6,5), confirmando la presencia de enzima endógena, pero su actividad es considerada insignificante y despreciable para el análisis de las hidrólisis con adición de proteasas (GH final entre 4-15%). Esto confirma lo obtenido en el presente trabajo y se puede concluir que en los esquelones de salmón, la actividad de enzimas endógenas es insignificante.

Las hidrólisis con las proteasas Alcalase, Protamex y Neutrase mostraron un leve aumento en la concentración de grupos α -amino liberados final ($C_{t=60}$) al incrementar la concentración de proteasa, mientras con la Flavourzyme, la hidrólisis mostró un mayor aumento de $C_{(t=60)}$. La hidrólisis con Alcalase aumentó en un 35,0% la $C_{t=60}$ al cuadruplicar la concentración de proteasa ($p<0,05$), pero entre los experimentos Alc-1 y Alc-2, Alc-2 y Alc-3 no se obtuvieron diferencias significativas ($p>0,05$). Con Protamex la $C_{t=60}$ aumentó en un 36,2% al cuadruplicar la concentración de proteasa ($p<0,05$) y en la hidrólisis con Neutrase 0,8L aumentó en un 46,5% al cuadruplicar la concentración de proteasa ($p<0,05$), no obteniéndose diferencias significativas entre Prota-2 y Prota-3, ni entre Neu-2 y Neu-3. La hidrólisis con Favourzyme 1000L mostró el mayor aumento de $C_{t=60}$, obteniendo una concentración final 94,9% mayor al cuadruplicar la concentración de proteasa y del 38,9% al duplicar la concentración de proteasa de 10,2 [Us/g esq] ($p<0,05$). El leve aumento de la concentración de grupos α -amino liberados final ($C_{t=60}$) frente al incremento de la concentración de proteasa se podría deber a la saturación de los sitios de anclaje E-S disponibles en el sustrato.

En la [Figura 23](#) se presentan las curvas de hidrólisis agrupadas por concentración de proteasa equivalentes. Las curvas obtenidas para la menor concentración de proteasa (5,2[Us/g esq]) resultan bastante similares entre sí, en especial las curvas de Alc-1 y Neu-1 ([Figura 23, a](#)). En mayoría de estos experimentos realizados con 5,2[Us/g esq] no se obtuvieron diferencias significativas en la concentración de grupos α -amino liberados final ($C_{t=60}$), excepto por el experimento fla-1, que mostró un valor 41,0% y 42,9% mayor que los experimentos Alc-1 y Neu-1 ($p<0,05$) respectivamente. Esta similitud de comportamiento a baja concentración de proteasa confirma la equivalencia de la concentración proteolítica de los experimentos, y con esto, también se confirma la validez del método propuesto “ensayo con esquelón de salmón” para la determinación de los valores de actividad proteolítica específica y cálculo de la concentración de proteasa.

En los experimentos con 10,4[Us/g esq] ([Figura 23, b](#)) se obtuvieron diferencias significativas en el valor de $C_{t=60}$ en la mayoría de los experimentos, excepto entre Alc-2 y Neu-2. Destaca el experimento Fla-2 que presentó un valor de $C_{t=60}$ 73,0%, 53,7% y 31,7% mayor que los obtenidos para Alc-2, Neu-2 y Prota-2 respectivamente ($p<0,05$). En los experimentos con 20,8[Us/g esq] ([Figura 23, c](#)) se obtuvieron diferencias significativas del valor $C_{t=60}$ solo entre el experimento Fla-3 y el resto de los experimentos ($p<0,05$), pero no entre los experimentos con Alcalase 2,4L, Neutrase 0,8L y Protamex. Se obtuvo el mayor valor de $C_{t=60}$ con el experimento Fla-3, igual a $335,3\pm24,5$ [mM], siendo 103,6%, 90,1% y 67,2% mayor que los valores obtenidos para Alc-3, Neu-3 y Prota-3 respectivamente.

En todas las concentraciones de proteasa evaluadas se observó un comportamiento similar entre las curvas de hidrólisis de la Alcalase 2,4L y la Neutrase 0,8L, lo cual se puede deber a que presentan un grado de inhibición de proteasa similar. Otro factor que explica esto es la similitud en la disponibilidad de los enlaces peptídicos específicos que hidroliza en el sustrato, dado que tanto la Alcalase como la Neutrase son endoproteasas que hidrolizan enlaces peptídicos de los aminoácidos hidrofóbicos Leu, Phe y Tyr (Sabadin, et al., 2012; Zhou, et al., 2016).

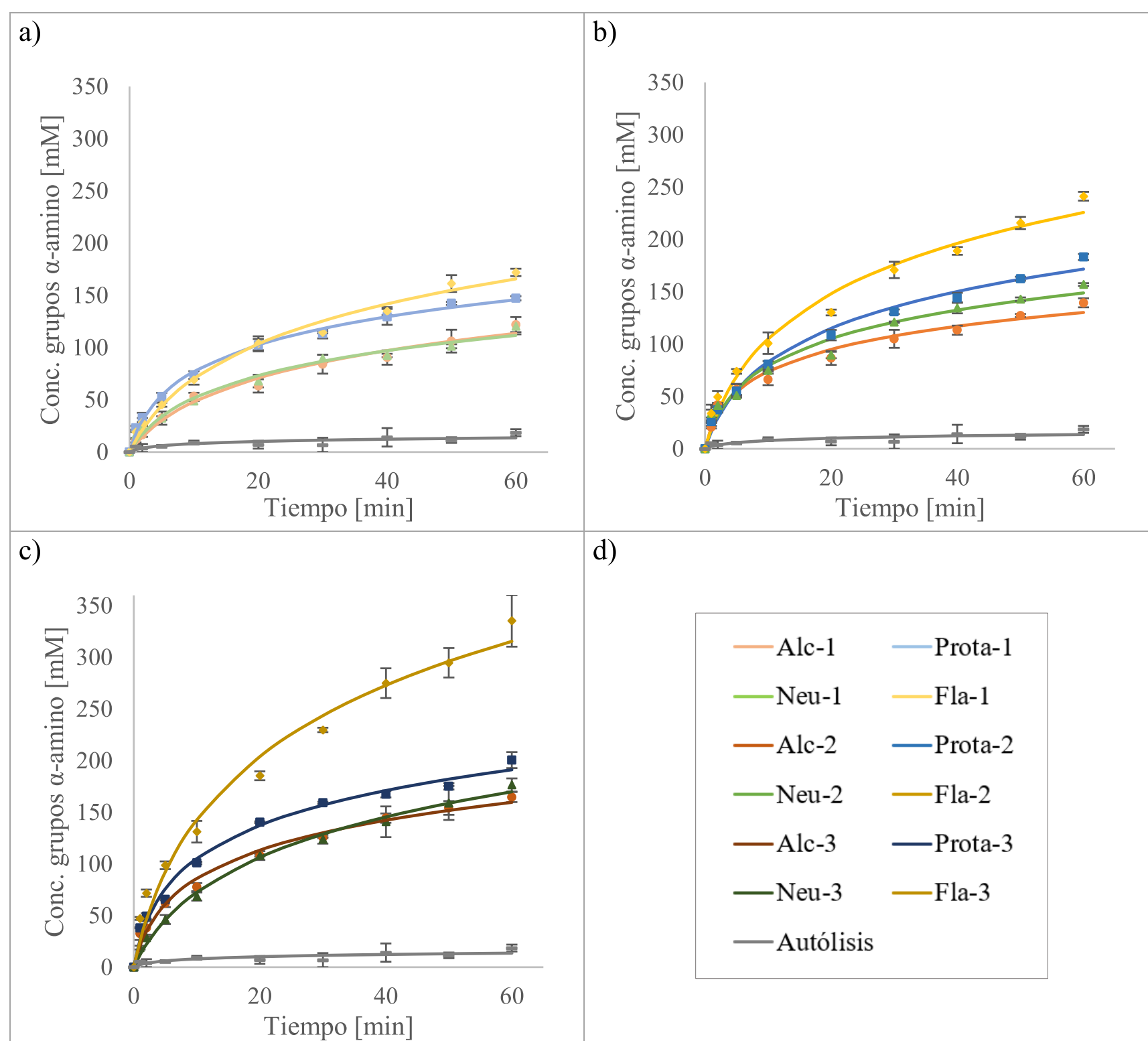


Figura 23. Curvas de hidrólisis de esquelón de salmón al 100%, 50°C, pH nativo y sin control de Alcalase 2,4L Protamex, Neutrase 0,8L y Flavourzyme 1000L a las concentraciones de proteasa: a) 5,2 [Us/g], b) 10,4 [Us/g] y c) 20,8 [Us/g]. d) leyenda. En viñeta los datos experimentales con sus barras de error y en líneas continuas se muestra el modelo ajustado. Elaboración propia.

En las dos mayores concentraciones de proteasa evaluadas (Figura 23, a y b) las curvas de la Flavourzyme se posicionan sobre las otras, seguidas por las curvas de la Protamex. Estas diferencias se pueden atribuir a que las proteasas sufren distinto grado de inhibición por producto y a la distinta disponibilidad en el sustrato de los enlaces peptídicos específicos que hidroliza

debido a la diferencia de especificidades que presentan. El mayor desempeño de la Flavourzyme por sobre las otras proteasas evaluadas se podría deber a que los enlaces peptídicos que hidroliza, que son los terminales, tiendan a presentarse más disponibles en el sustrato que los enlaces internos, y también a que se van generando nuevos enlaces peptídicos terminales a medida que transcurre la reacción. Esto considerando que la Flavourzyme es la única proteasa evaluada con actividad exo-proteolítica.

El mayor desempeño obtenido para la hidrólisis con Protamex, que contiene una mezcla de endoproteasas (subtilisina y bacilolisina), por sobre la hidrólisis con Alcalase (subtilisina) y Neutrase (bacilolisina) se puede explicar por la transformación de los productos que inhiben a una proteasa por parte de la otra proteasa formando una especie de sinergia entre las dos proteasas, es decir, los productos formados por la subtilisina son transformados por la bacilolisina y/o viceversa, disminuyendo así la concentración de productos inhibidores, y por ende, el grado de inhibición. De ocurrir esto, los productos formados por la Protamex deben ser distintos de los productos formados por la Alcalase y la Neutrase individualmente, lo cual efectivamente ocurre según lo reportado por Zhang et al (2022), que analizó los hidrolizados de piel de salmón obtenidos con Protamex, Alcalase y Neutrase, obteniéndose una distribución de masa molecular distintas en los tres casos; 66%<1.000Da, 20%<2.000Da, 14%<4.000Da con Protamex; 85%<1.000Da, 15%>2.000Da con Alcalase; y 33%<1.000Da, 18%<2.000Da, 28%<4.000Da, 8%<6.000Da, 10%<10.000Da, 3%>10.000 con Neutrase (Zhang, et al., 2022).

5.3.2. *Parámetros del modelo logarítmico*

Se realizó el ajuste de las curvas de hidrólisis con el modelo logarítmico (presentado en la ecuación (4.4.13) del ítem 4.4.3) a partir de los datos experimentales de concentración de grupos alfa amino liberados en el tiempo ($C_{(t)}$) y se obtuvieron los parámetros a [mM/min] y b [mM^{-1}] que se presentan en la Tabla 11. Los ajustes del modelo presentan valores de coeficiente de correlación por sobre 0,97. Se realizó una prueba de significancia de los parámetros ajustados, lo cual se encuentra en el Anexo F.

En el trabajo de Valdivia (2021) se realiza un ajuste de parámetros de un experimento comparable con Acl-3, obteniéndose valores bastante cercanos a los obtenidos en el presente trabajo, $18,62 \pm 2,80$ [mM/min] para el parámetro a y $0,015 \pm 0,0015$ [mM^{-1}] el parámetro b , lo que verifica el ajuste obtenido en el presente trabajo (condiciones experimento: 13[mAU/g] Alcalase 2,4L, 100% esquelón de salmón, 55°C, pH nativo y sin control) (Valdivia, 2021).

Para analizar cómo influye la proteasa y su concentración sobre la velocidad inicial de la hidrólisis, se grafica el parámetro a [mM/min] del modelo (Figura 24). Al comparar entre las distintas concentraciones de proteasa evaluadas para una misma preparación de proteasa se tiene que no se obtuvieron diferencias significativas ($p>0,05$) entre los experimentos: i) Alc-1 y Alc-3, Alc-2 y Alc-3, ii) Prota-1 y Prota-2, Prota-1 y Prota-3, iii) Neu-1 y Neu-3, iv) Fla-2 y Fla-3, lo cual se debe en parte a que los errores de estimación del parámetro a son altos en comparación con su valor.

Sin embargo, notamos que el valor de la velocidad inicial no se relaciona linealmente con la concentración de proteasa en los resultados mostrados en la [Figura 24](#), lo cual si ocurre en las concentraciones evaluadas en los ensayos de actividad debido a la baja concentración de proteasa utilizada (concentración máxima equivalente a 0,77[Us/g ensayo]) y baja concentración de sustrato (1% proteína). Esto se podría deber a una saturación de los sitios de anclaje del sustrato o efectos de inhibición por sustrato en la hidrólisis con altas concentraciones de proteasa (5,2-20,8[Us/ g esq]) y de sustrato (15,83% proteína).

Tabla 11. Parámetros a [mM/min] y b [mM⁻¹] del modelo logarítmico ajustados a datos experimentales de hidrólisis de esquelón de salmón (al 100%, 60 min a 50°C, pH nativo y sin control). Elaboración propia.

Experimento	a [mM/min]	Error parámetro a	b [1/mM]	Error parámetro b	R^2 ajustado
Alc-1	8,60	1,46	0,022	0,0028	0,985
Alc-2	27,15	5,88	0,030	0,0029	0,980
Alc-3	26,28	4,24	0,023	0,0018	0,988
Prota-1	22,24	2,11	0,024	0,0012	0,996
Prota-2	19,01	3,02	0,018	0,0017	0,987
Prota-3	34,67	5,70	0,020	0,0015	0,988
Neu-1	10,83	2,14	0,026	0,0033	0,980
Neu-2	23,58	6,04	0,024	0,0030	0,970
Neu-3	13,08	1,41	0,015	0,0012	0,994
Fla-1	12,62	1,88	0,015	0,0017	0,988
Fla-2	22,08	4,41	0,013	0,0016	0,979
Fla-3	28,40	5,67	0,009	0,0012	0,979

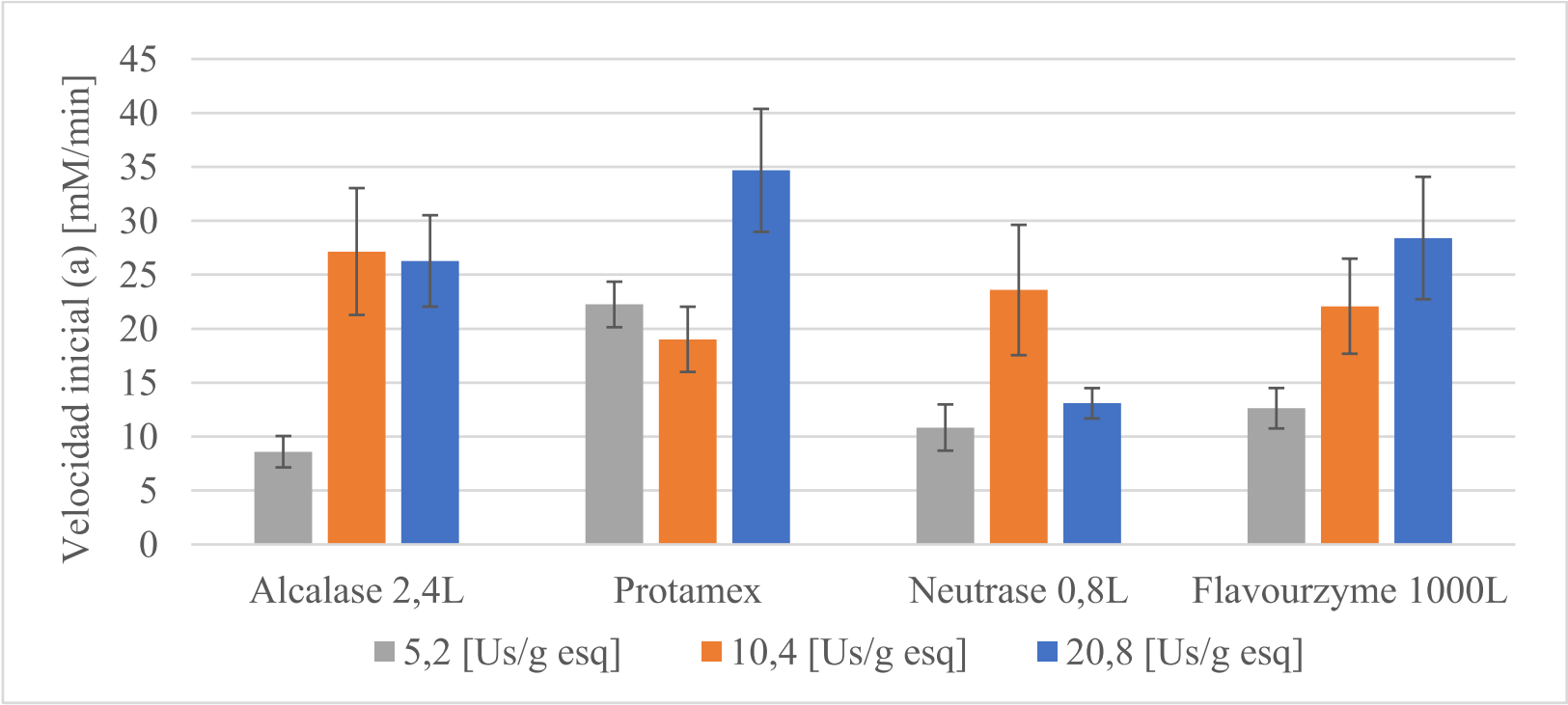


Figura 24. Valor de la velocidad inicial (parámetro a [mM/min]) para la hidrólisis de esquelón de salmón con distintas proteasas comerciales y a tres concentraciones de proteasa; 5,2, 10,4 y 20,8 [Us/g] (100% subproducto, 50°C, pH nativo y sin control). Elaboración propia.

No se obtuvieron diferencias significativas entre valores del parámetro a de los experimentos de 5,2[Us/g enz], ni entre los de 10,4[Us/g enz] ($p>0,05$), lo cual es razonable ya que se realizaron en una concentración de proteasa equivalente. En los experimentos de mayor concentración de proteasa, 20,8[Us/g enz] solo se obtuvieron diferencias significativas entre la Neutrase y las otras preparaciones de proteasa (Neu-3 y Alc-3, Neu-3 y Prota-3, Neu-3 y Fla-3), el menor valor de velocidad inicial obtenido en comparación a las otras proteasas se podría atribuir a una menor disponibilidad de los enlaces peptídicos específicos sobre los que actúa en el sustrato o a que presente mayor grado de inhibición.

5.3.3. Susceptibilidad proteolítica

La susceptibilidad proteolítica (SP) obtenida para cada experimento se presenta en la [Figura 25](#). La mayor SP se presenta para la hidrólisis con 20,8 [Us/g] de Flavourzyme (Fla-3), con un valor de 3.230 [mM²/min] siendo 177% mayor respecto al segundo mayor obtenido (Prota-3) ($p<0,05$). En todas las proteasas se pudo observar una tendencia al aumento del SP con el aumento de la concentración de proteasa, excepto para la Neutrase 0,8L y que se mantiene aproximadamente constante en sus dos concentraciones más altas (Neu-2 y Neu-3), no existiendo diferencias significativas entre ellas ($p>0,05$).

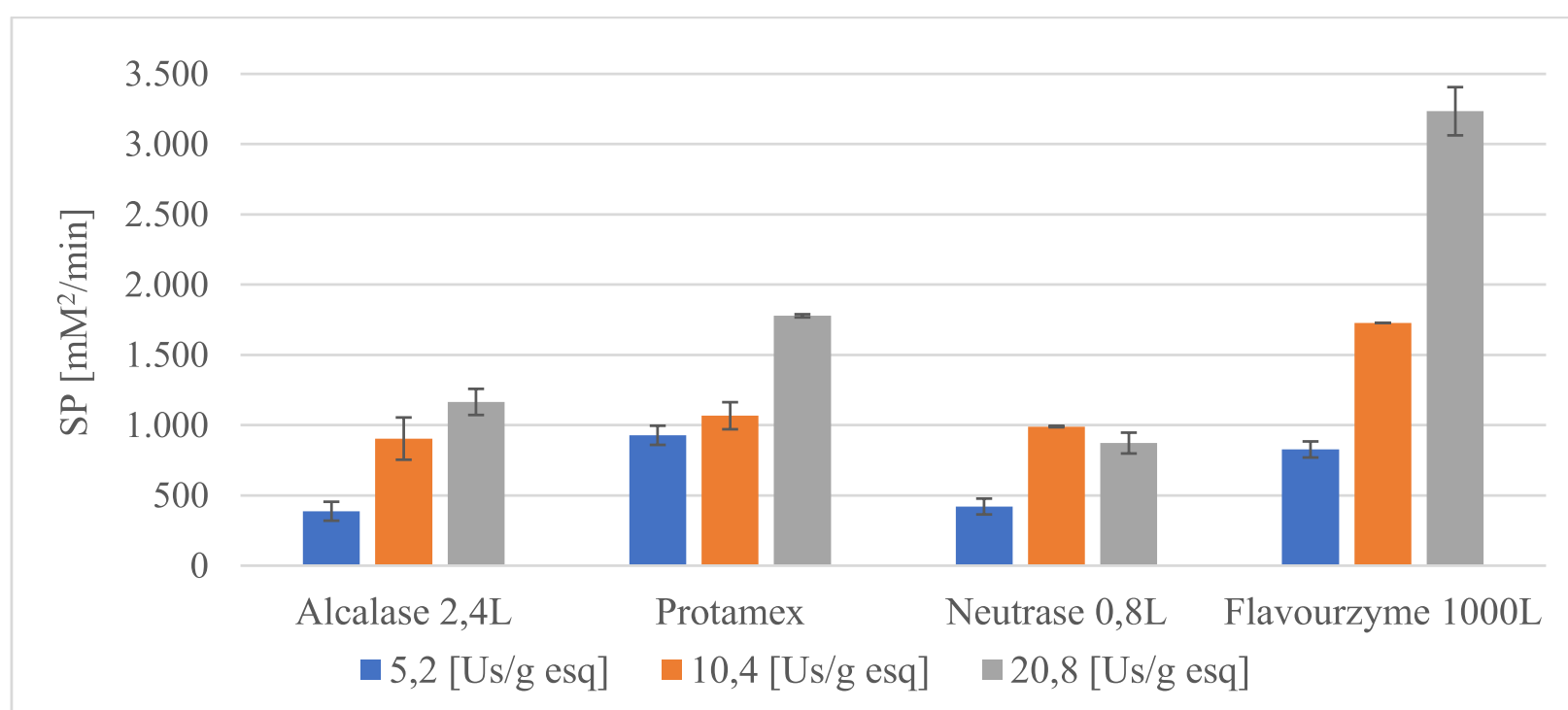


Figura 25. Susceptibilidad proteolítica del esquelón de salmón frente a la hidrólisis con Alcalase 2,4L, Protamex, Neutrase 0,8L, Flavourzyme 1000L. Condiciones de reacción: 100% esquelón de salmón, 50°C, pH nativo y sin control, concentraciones de proteasa de 5,2; 10,4 y 20,8 [Us/g esq]. Elaboración propia.

En el trabajo de Valencia et al. (2019) se propuso la susceptibilidad proteolítica específica (respecto a la enzima) como indicador cuantitativo, obteniendo una relación lineal entre la SP y concentración de proteasa para la hidrólisis de diferentes fuentes de proteínas (incluyendo musculo de salmón) con Alcalase 2,4 L en concentraciones de proteasa de 0,25, 0,5 y 1 [mAU/g] y bajas concentraciones de proteína (bajo 1%) (Valencia, et al., 2019).

Para evaluar si el efecto de la concentración de proteasa sobre la SP es contante y así calcular la susceptibilidad proteolítica específica (SPEe), se graficaron los valores obtenidos de la SP de cada preparado de proteasas frente a la concentración de proteasa y se realiza una regresión linear, lo cual se presenta [Figura 26](#).

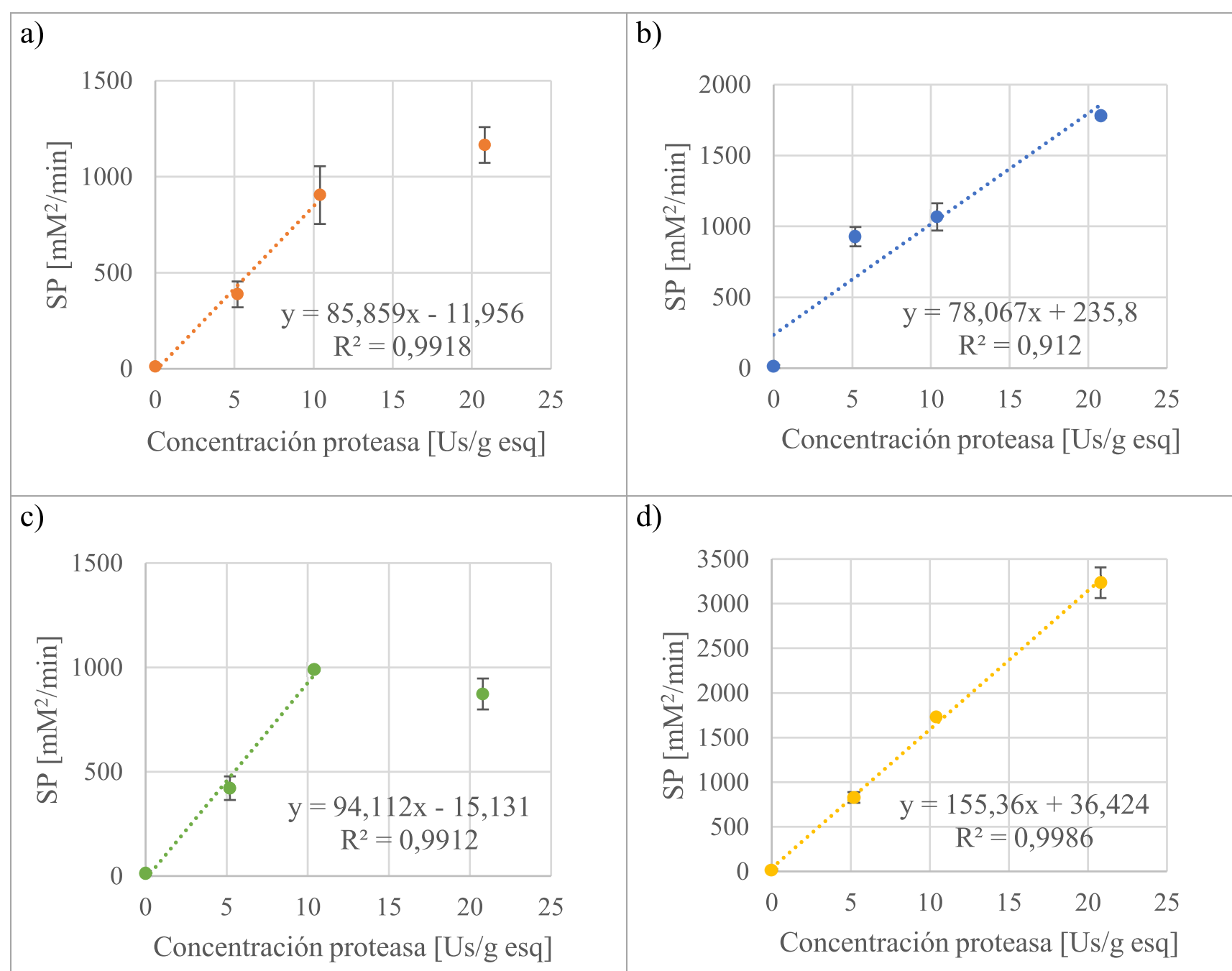


Figura 26. Gráficos de susceptibilidad proteolítica (calculada como razón a/b) versus concentración de proteasa para hidrólisis se esquelón de salmón molido (100% esquelón, 50°C, pH nativo y sin control) con a) Alcalase 2,4L, b) Protamex, c) Neutrase 0,8L y d) Flavourzyme 1000L. En líneas punteadas se muestra relación linear usada para cálculo de la SPE. Elaboración propia.

Se obtuvo una relación linear del valor SP con la concentración de proteasa para todos los experimentos realizados con Protamex y Flavourzyme, lo cual se muestra en la [Figura 26](#). Pero en los experimentos realizados con Alcalase y Neutrase, la gráfica mostró una relación linear solo para las primeras dos concentraciones enzimáticas, 5,2 y 10,4 [Us/g], en la mayor concentración (20,8[Us/g esq]) el valor de la SP se mantiene constante con la Neutrase y aumenta en menor medida para el caso de la Alcalase, no obteniéndose diferencias significativas entre el valor de SP de Alc-2 y Alc-3, ni entre Neu-2 y Neu-3 ($p > 0,05$). Esta pérdida de la linealidad en la relación entre SP y la concentración de proteasa se puede atribuir a la alta concentración de proteína (15,83%) usada y altas concentraciones de proteasa en comparación con lo expuesto en el trabajo

de Valencia et al. (2019). A modo general se tiene que en las condiciones de hidrólisis de 100% de esquelón de salmón, 50°C, pH nativo y sin control tratado con Alcalase 2,4L o con Neutrase 0,8L existe una concentración de proteasa en la que la SP llega a su máximo, manteniéndose constante su valor al tratar con mayores concentraciones. De todas formas, se calculó la susceptibilidad proteolítica específica considerando las rectas presentadas en la [Figura 26](#), obteniéndose la mayor SPEe para la hidrólisis con Flavourzyme, con un valor de $155,4 [mM^2 g_{esq} \min^{-1} U_s^{-1}]$, seguida por la con Neutrase, la Alcalase y la Protamex con 94,1; 85,9 y 78,1 $[mM^2 g_{esq} \min^{-1} U_s^{-1}]$ respectivamente.

5.1.1. Fracción soluble

Los resultados de fracción soluble (FS) del hidrolizado obtenido luego de 60 min de reacción se presentan en la [Figura 27](#). Los resultados en formato numérico se presentan en el [Anexo G](#).

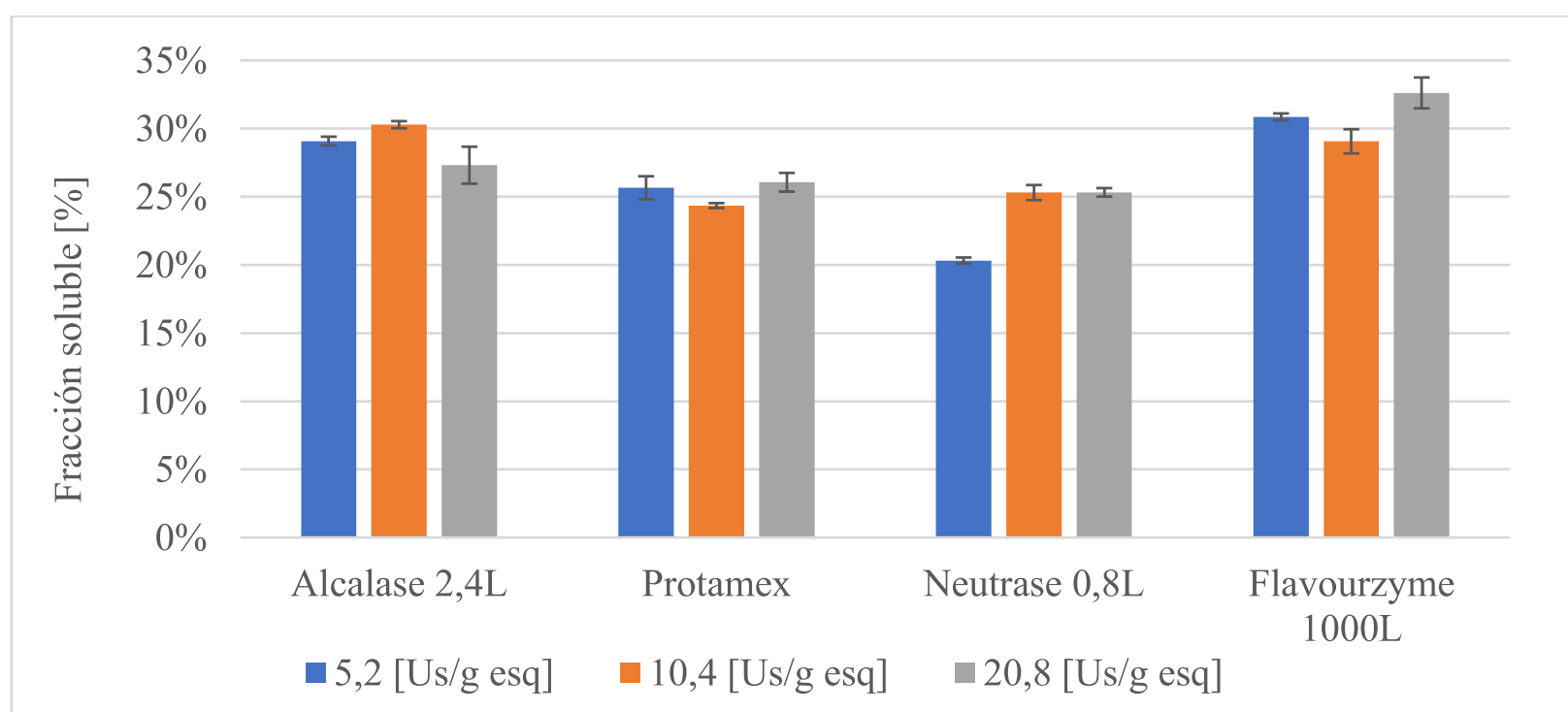


Figura 27. Fracción soluble másica luego de 60 min de hidrólisis de esquelón de salmón con diferentes proteasas comerciales y concentraciones de proteasa. Condiciones de reacción: 100% esquelón de salmón, 50°C, pH nativo y sin control, concentraciones de proteasa de 5,2; 10,4 y 20,8 $[U_s/g \text{ esq}]$. Elaboración propia.

El experimento Fla-3 mostró la mayor fracción soluble, con un valor de $32,6\% \pm 1,1\%$ y el experimento Neu-1 presentó la menor con $20,3\% \pm 0,2\%$. Al comparar los valores de FS obtenidos en una misma concentración de proteasa, se obtuvo que con 5,2 y 10,4 $[U_s/g \text{ esq}]$ los valores más altos los presentan los experimentos realizados con Flavourzyme y Alcalase ($p < 0,05$), no presentando diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$). Con 20,8 $[U_s/g \text{ esq}]$ se obtuvo que Fla-3 presento el mayor valor de FS ($p < 0,05$), mientras que para los otros experimentos no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$).

De los resultados presentados en la [Figura 27](#), no se observa relación entre la concentración de proteasa y la FS obtenida, de hecho, en general el valor de FS se mantiene aproximadamente constante con el aumento de la concentración para una misma proteasa. Esto ocurre con los todos los experimentos realizados con Alcalase, Protamex y Flavourzyme, no obteniéndose diferencias

significativas entre Alc-1, Alc-2 y Alc-3, entre Prota-1, Prota-2 y Prota-3 ni entre Fla-1, Fla-2 y Fla-3 ($p>0,05$). La única proteasa comercial que mostró una diferencia significativa del valor FS es la Neutrase, que en los experimentos Neu-2 y Neu-3 se obtuvo un valor de FS 25% mayor que Neu-1 ($p<0,05$), sin embargo, en los experimentos Neu-2 y Neu-3 el valor de FS se mantuvo constante (sin diferencias significativas $p>0,05$). Con esto podemos hacer la hipótesis de que para las condiciones de hidrólisis probadas (100% esquelón, 50°C, pH nativo sin control) existe una concentración de proteasa, propia de cada proteasa, a la cual se obtiene un máximo de fracción soluble, y que, a pesar de aumentar la dosis de proteasa por sobre dicha concentración, la FS se mantiene constante. Esto podría atribuirse a restricciones de liberación de agua inmovilizada hacia la fase soluble del hidrolizado, relacionadas con la capacidad de retención de agua del subproducto.

5.1.2. Recuperación de nitrógeno

Los resultados de recuperación de nitrógeno a la fase soluble (RN) se presentan graficados en la [Figura 28](#), los valores de concentración de grupos alfa amino totales en la fase soluble ($C_{(H.total)}$) y la recuperación de nitrógeno en formato numérico se encuentran en el [Anexo G](#).

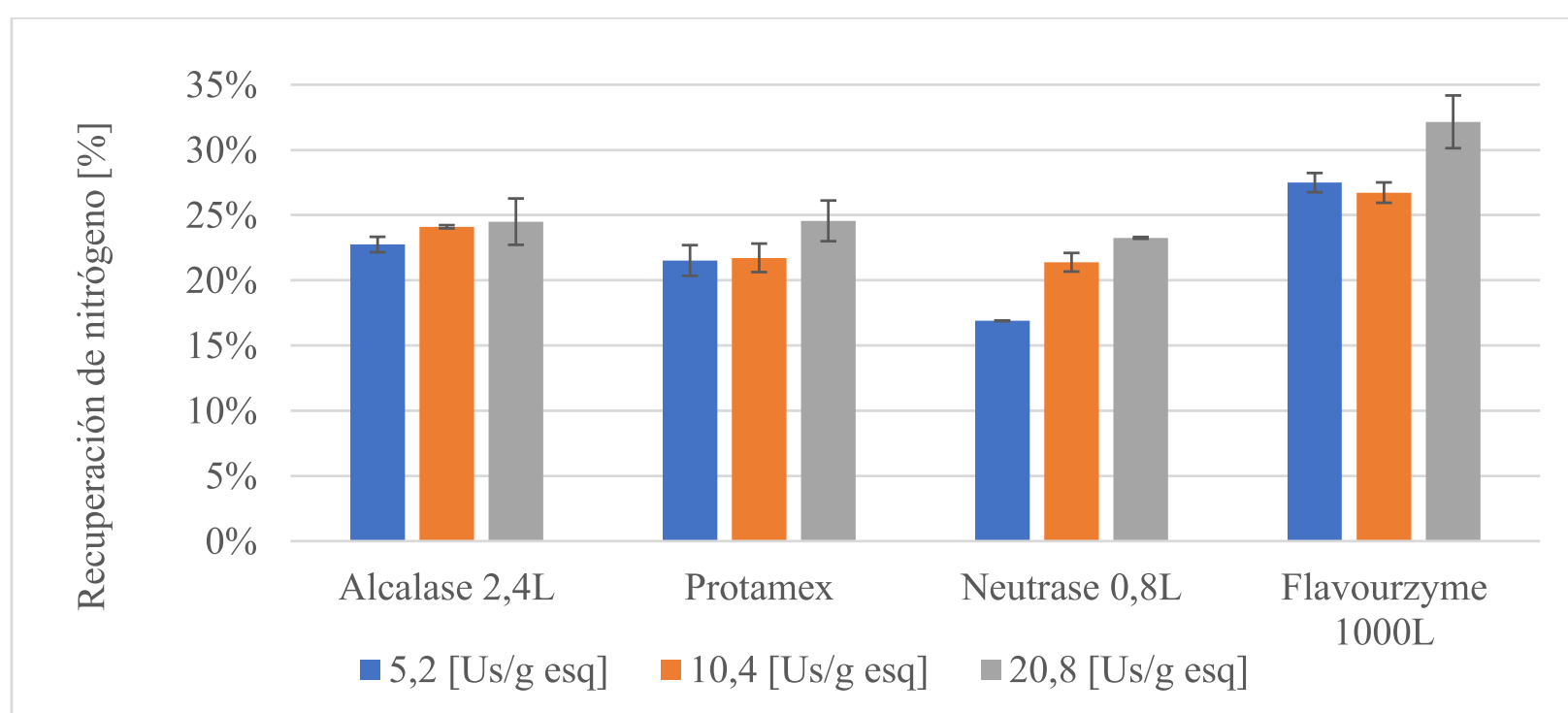


Figura 28. Recuperación de nitrógeno de la fracción soluble luego de 60 min de hidrólisis de esquelón de salmón con diferentes proteasas comerciales. Condiciones de reacción: 100% esquelón de salmón, 50°C, pH nativo y sin control, concentraciones de proteasa de 5,2; 10,4 y 20,8 [U_s/g esq]. Elaboración propia.

Los valores de RN de los experimentos realizados con la menor concentración de proteasa (5,2[Us/g esq]) presentaron diferencias significativas entre casi todos ellos ($p<0,05$), obteniéndose la mayor RN con Fla-1, seguida por Alc-1 y Prota-1 (sin diferencias significativas entre ellos $p>0,05$), y finalmente Neu-1. Pero los experimentos realizados con 10,4[Us/g esq] se obtuvo diferencias significativas del valor de RN solo entre Fla-2 y Prota-2, y entre Fla-2 y Neu-2 ($p<0,05$), pero no entre Fla-2 y Alc-2 ($p>0,05$). En los experimentos realizados con 20,8[Us/g esq] no se obtuvieron diferencias significativas del valor de RN entre ninguno de ellos.

Respecto a la influencia de la concentración de proteasa sobre la RN, podemos notar que en las hidrólisis con Neutrase existe una tendencia a aumentar cuando se duplica la concentración de proteasa, sin embargo, en los experimentos con Alcalase, Protamex y Flavourzyme el valor de RN se mantiene aproximadamente constante, no obteniéndose diferencias significativas entre Alc-1, Alc-2 y Alc-3, entre Prota-1, Prota-2 y Prota-3, ni entre Fla-1, Fla-2 y Fla-3 ($p>0,05$). Esto puede atribuirse a efectos de inhibición por producto y por sustrato. Estos resultados son relevantes para el escalamiento de los procesos de hidrólisis de subproducto de pescado a nivel industrial, ya que, al usar una alta cantidad de proteasa, se tendría el mismo rendimiento de recuperación de nitrógeno del subproducto que con una cantidad 4 veces menor, pero a un costo mucho mayor. Esto último se evaluará más adelante en el [ítem 5.5 “Evaluación costo proteasa – rendimiento”](#).

En el trabajo de Valdivia (2021) se presentan resultados de un experimento comparable con Alc-3, ya que se realiza con una concentración equivalente de proteasa (13 AU/kg) y a condiciones de reacción similares (100% esquelón de salmón, 55°C, pH nativo sin control, 60 min de reacción) (Valdivia, 2021). En dicho trabajo se obtiene un valor de RN de alrededor de 25%, lo cual confirma el resultado obtenido para Alc-3 que es de $24,50\% \pm 1,78\%$ y además podemos notar que el cambio de la temperatura de reacción de 55°C a 50°C no afecta significativamente el valor de RN obtenido.

5.1.3. Grado de hidrólisis

Los resultados de grado de hidrólisis obtenido luego de 60 min de reacción se presentan en la [Figura 29](#), los valores de concentración de grupos alfa amino libres en el tiempo cero ($C_{\text{alfa amino libres}}_{t=0}$), concentración de grupos alfa amino liberados a los 60 min ($C_{(t=60 \text{ min})}$) y grado de hidrólisis (GH) en formato numérico se encuentran en el [Anexo G](#).

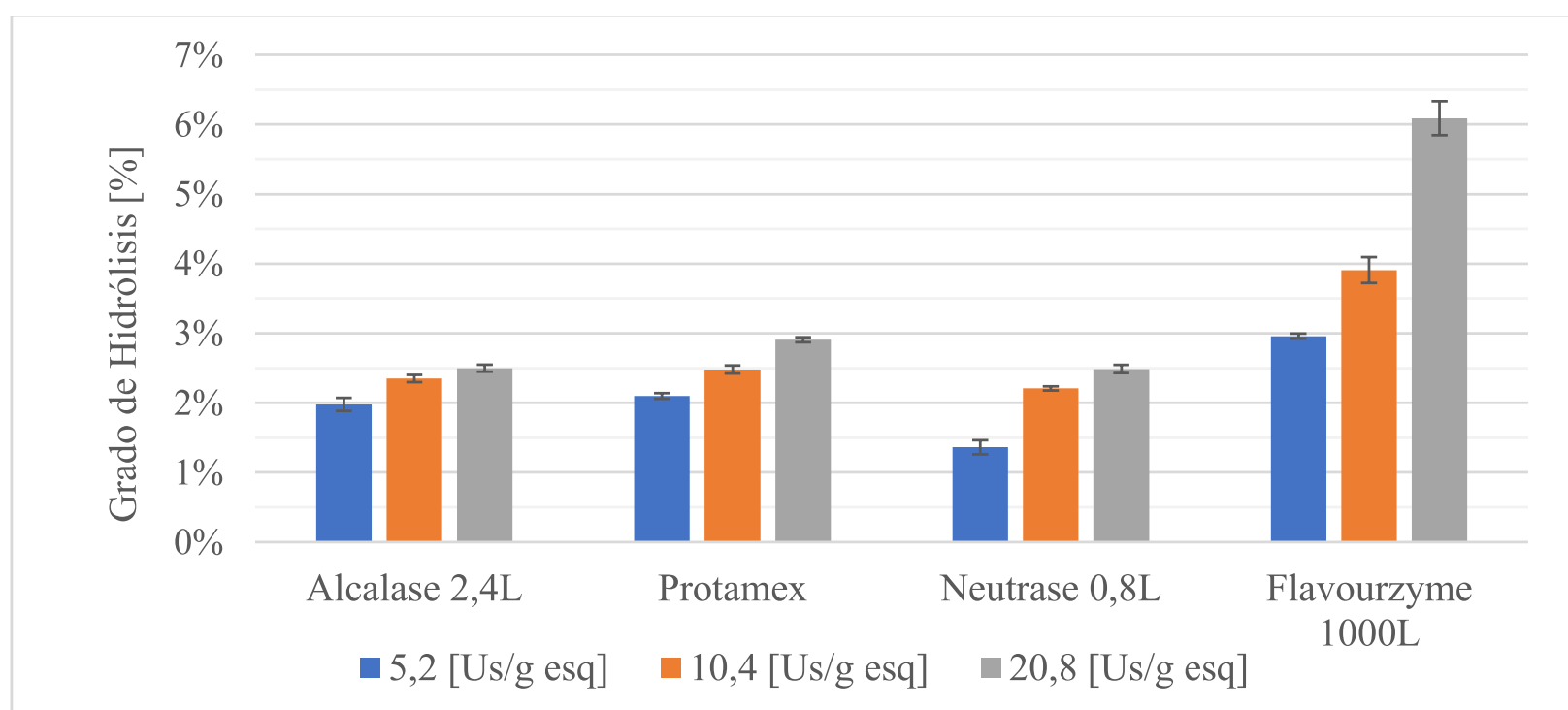


Figura 29. Grado de hidrólisis obtenido a los 60 min de hidrólisis de esquelón de salmón con diferentes proteasas comerciales. Condiciones de reacción: 100% esquelón de salmón, 50°C, pH nativo y sin control, concentraciones de proteasa de 5,2; 10,4 y 20,8 [$U_s/g \text{ esq}$]. Elaboración propia.

De lo presentado en la [Figura 29](#), podemos notar que la mayoría de las proteasas evaluadas presentan un GH entre 1,5% a 3%, excepto por la Flavourzyme, que muestra los mayores valores de GH, entre 3 y 6%, siendo $6,09\% \pm 0,24\%$ el valor más alto obtenido para el experimento Fla-3 ($p < 0,05$). Los experimentos realizados con Flavourzyme obtuvieron un mayor GH que las otras proteasas en las tres concentraciones evaluadas ($p < 0,05$). No se obtuvieron diferencias significativas entre las otras proteasas en una misma concentración de proteasa, excepto por el experimento Neu-1, con el cual se obtuvo el menor valor de GH ($p < 0,05$). Este resultado tiene bastante sentido si recordamos que la Flavourzyme es la única proteasa de las evaluadas, que contiene mezcla de endo y exo-peptidasa, es decir que es la única proteasa con la capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos terminales y que suelen ser más expuestos que los internos y por ende son de más fácil acceso para el sitio activo de la enzima, facilitando así la formación del complejo ES.

En el trabajo de Valencia et al. (2021) comentado anteriormente, se obtiene un GH de 3% a los 60 minutos (100% esquelón de salmón, 55°C, pH nativo sin control, 60 min de reacción). Al comparar este resultado con lo obtenido para el experimento Alc-3, notamos que son similares, lo que valida el resultado obtenido, sin embargo, a la vez notamos que se obtuvo un GH menor, lo que se puede atribuir a la disminución de la temperatura de reacción en 5°C.

Respecto a la influencia de la concentración de proteasa sobre el GH obtenido, existe una tendencia al aumento del GH con una mayor concentración para todas las proteasas evaluadas ($p < 0,05$), sin embargo, se obtiene que no existe una correlación lineal entre GH y concentración de proteasa (analizado mediante calculo t_R). El mayor aumento porcentual del GH lo presenta la Flavourzyme, su valor aumenta un 32,1% respecto al obtenido con Fla-1 cuando se duplica la concentración de proteasa, y aumenta un 105,8% cuando se cuadruplica. Luego le sigue la Neutrase, que presenta un aumento del 62,1% respecto a Neu-1 cuando se duplica la concentración de proteasa y un 82,6% cuando se cuadruplica. Las proteasas Alcalase y Protamex mostraron una menor variación en su valor de GH con un aumento del 18,1% y 18,7% respectivamente cuando la concentración de proteasa se duplica y del 26,3% y 38,4% respectivamente cuando se cuadruplica la concentración de proteasa.

5.4. Evaluación del costo de las proteasas

Los resultados de costo por unidad de actividad para la Alcalase 2,4L, Protamex, Neutrase 0,8L y Flavourzyme 1000L se presentan en la [Tabla 12](#). Los valores de costo de proteasa obtenidos en unidades del ensayo con esquelón, [USD/ 10^6 Us], son las que se considerarán para las discusiones y conclusiones de lo que continúa del presente trabajo ya que representan la interacción sustrato-enzima de los experimentos realizados. Sin embargo, también se presentan en unidades del ensayo estándar de azocaseína, [USD/ 10^6 U], para otorgar una medida de comparación del costo por unidad de actividad de estas proteasas para hidrólisis con otro tipo de proteína como suero de leche, entre otras.

De los resultados se obtiene que la proteasa comercial de menor costo es la Alcalase 2,4L con un costo de actividad de 8,1[USD/10⁶ Us]. La proteasa con mayor costo por unidad de actividad es la Flavourzyme 1000L, con un valor 5 veces mayor que la Alcalase 2,4L.

Tabla 12. Evaluación del costo en dólares (USD) de las proteasas por unidad de actividad. Elaboración propia.

Proteasa	Precio proteasa ¹ [USD/kg]	Ensayo con azocaseína ²		Ensayo con esquelón de salmón ³	
		Actividad específica [U/g]	Costo actividad [USD/10 ⁶ U]	Actividad específica [Us/g]	Costo actividad [USD/10 ⁶ Us]
Alcalase 2,4L	30,95	1112,4	27,8	3835,5	8,1
Protamex	62,66	468,7	133,7	2580,6	24,3
Flavourzyme 1000L	67,74	193,8	349,5	1673,9	40,5
Neutrase 0,8L	22,95	138,7	165,5	1363,8	16,8

¹: Cotización realizada en diciembre del 2022 por el distribuidor Girona S.A. (Santiago, Chile).

²: 10 min incubación a 50°C en sustrato de azocaseína al 1% en solución tampón sodio fosfato (50mM, pH 7,5), cuantificación por espectrofotometría a 440nm.

³: 10 min incubación a 50°C en sustrato de esquelón de salmón (1% proteína), pH 7,5, cuantificación por valoración con NaOH 0,05N.

En el trabajo de Aspevik et al. (2016) se presenta una evaluación el costo de proteasa por unidad de actividad para Alcalase 2,4L, Neutrase 0,8L y otras 3 proteasas comerciales realizando un ensayo de actividad con caseína (10 min incubación a 50°C, pH 6,5, cuantificación por espectrofotometría) similar al ensayo con azocaseína realizado para el presente trabajo (Aspevik, et al., 2016). En la evaluación de Aspevik et al. (2016) se obtiene un costo de 24 [USD/10⁶ U] para la Alcalase 2,4L y de 31 [USD/10⁶ U] para la Neutrase 0,8L, siendo la Protex 7L de menor costo con 18 [USD/10⁶ U] (1EUR=1,07USD).

Si comparamos estos resultados con los presentados en la [Tabla 12](#) en unidades del ensayo con azocaseína, notamos que obtenemos un costo de actividad bastante similar para la Alcalase 2,4L, con aumento de 4 [USD/10⁶ U] aprox. que se explica por la variación del índice de precios (ipc) con el paso del tiempo y diferencias de proveedores. Sin embargo, para Neutrase se obtiene un valor bastante superior al obtenido por Aspevik. Esto se puede atribuir a un aumento del precio de la proteasa por la masificación de su uso. Aunque, por otro lado, si comparamos el valor de actividad específica para la Neutrase 0,8L obtenido por Aspevik notamos que representa aproximadamente 40% del valor de actividad específica de la Alcalase 2,4L, mientras que el valor de actividad específica obtenida para la Neutrase 0,8L en el presente trabajo representa solo el 12% de la actividad específica de la Alcalase 2,4L. Esto nos sugiere que el valor de actividad específica de la Neutrase 0,8L obtenido por Aspevik es mayor al obtenido en el presente trabajo, lo cual explicaría el elevado costo de la proteasa por unidad de actividad obtenido.

5.5. Evaluación del costo de proteasa- rendimiento

Se realizó la evaluación del costo asociado al consumo de proteasa frente al rendimiento de la hidrólisis expresado en masa de nitrógeno recuperado en la fase soluble del hidrolizado. El costo-rendimiento de un experimento se calculó según la ecuación (4.4.24) presentada en la sección de métodos. Los valores de costo-rendimiento obtenidos para cada experimento se presentan en la Figura 30.

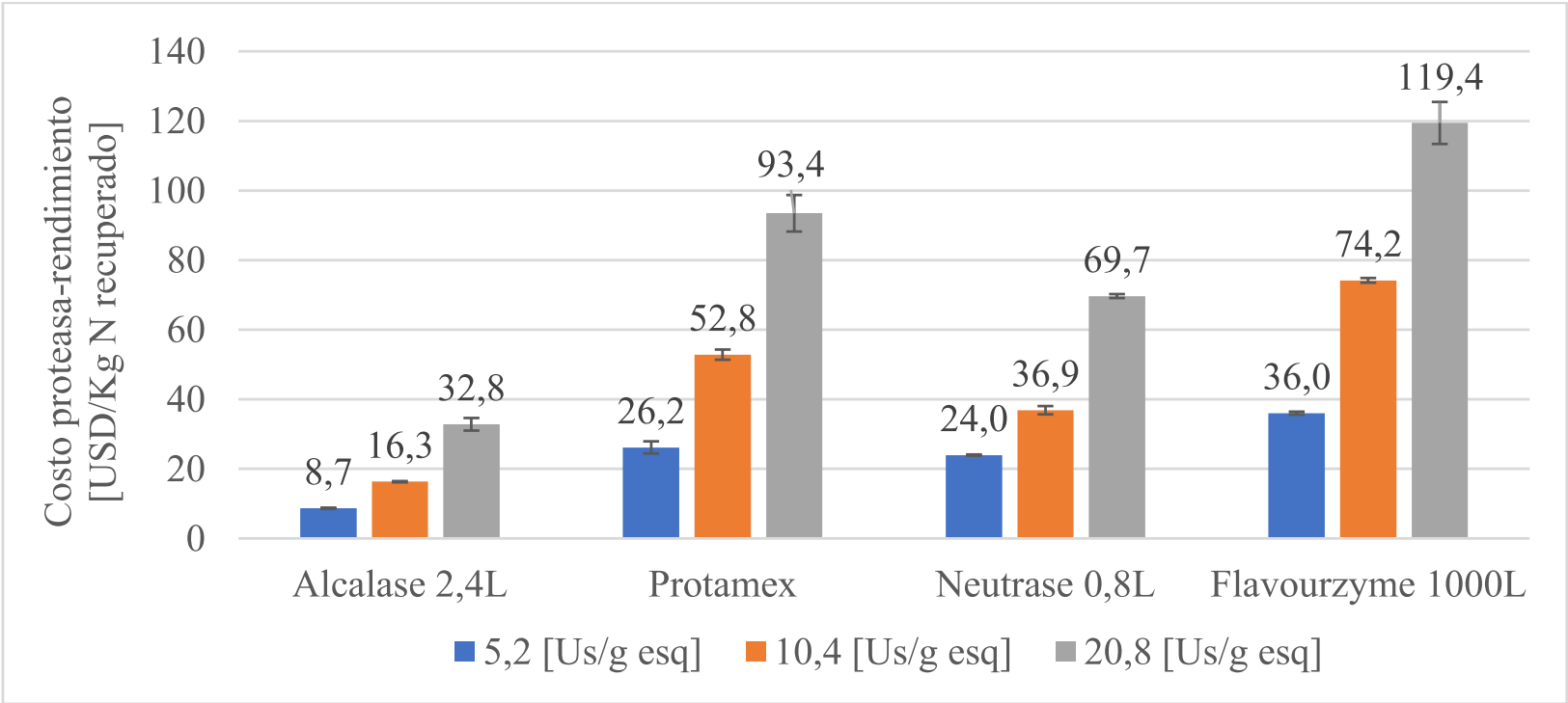


Figura 30. Resultados del costo de proteasa-rendimiento de la hidrólisis de esquelón de salmón con Alcalase 2,4L, Protamex, Neutrase 0,8L y Flavourzyme 1000L en las concentraciones de proteasa de 5,2; 10,4 y 20,8 [Us/g esq]. Condiciones de hidrólisis: 100% esquelón de salmón molido, 50°C, pH nativo y sin control, 60 min de reacción. Elaboración propia.

Al comparar la influencia del aumento de dosis de proteasa sobre el valor del costo proteasa-rendimiento, notamos que para todas las proteasas se obtiene un menor valor con la concentración de 5,2 [Us/g]. Lo cual se explica por la poca o nula variación que se obtuvo de recuperación de nitrógeno entre una concentración y otra.

Al comparar los valores de costo-rendimiento obtenidos de distintas proteasas, pero a la misma concentración de proteasa, notamos que la Alcalase 2,4L presenta un menor valor para las tres concentraciones, obteniéndose que el menor costo-rendimiento igual a 8,7[USD/kg N] en el experimento Alc-1. La proteasa que muestra mayores valores del costo-rendimiento en todos los casos fue la Flavourzyme 1000L, obteniéndose el mayor valor igual a 119,4 [USD/kg N] para el experimento Fla-3.

VI. CONCLUSIÓN

Se ha realizado una evaluación técnico-económica de distintas proteasas comerciales para la hidrólisis de esquelón de salmón en condiciones deseables para la industria (100% subproducto, pH nativo sin control). La hidrólisis con Flavourzyme 1000L presentó mayores valores de concentración de grupos α -amino liberados, susceptibilidad proteolítica, recuperación de nitrógeno y grado de hidrólisis, que las otras proteasas evaluadas. No obstante, la proteasa comercial de menor costo por unidad de actividad proteolítica indudablemente es la Alcalase 2,4L con un costo de 8,1 [USD/ 10^6 Us]. Para todas las proteasas evaluadas se obtiene una mejor relación costo proteasa-rendimiento con la menor concentración de proteasa usada, 5,2[Us/g esq]. La hidrólisis con mejor relación costo proteasa-rendimiento corresponde a la realizada con 5,2[Us/g esq] de Alcalase 2,4L con un valor de 8,7[USD/kg N]. Frente a esto se concluye que, de las cuatro proteasas comerciales y las tres concentraciones evaluadas, la utilización de Alcalase 2,4L en concentración de 5,2[Us/gesq] (equivalente a 3,25 mAU/g esq) es la más conveniente para la hidrólisis de esquelón de salmón.

Los resultados recopilados en el presente trabajo pueden ser utilizados para el diseño y evaluación económica del proceso de hidrólisis enzimática de subproductos de salmón con cualquiera de las proteasas estudiadas. La evaluación del costo por unidad de actividad proteolítica de las proteasas es presentada en dos unidades de actividad de forma que sirvan como precedente para el diseño de procesos de hidrólisis con proteína de pescado (usando [USD/ 10^6 Us]), o bien para la hidrólisis de otras fuentes proteicas (usando USD/ 10^6 U).

VII. PROYECCIONES

Como trabajo a futuro se propone una evaluación económica de la hidrólisis enzimática de esquelón de salmón para determinar los costos de operación del proceso usando las condiciones no ideales planteadas en el presente estudio. También se propone realizar una estimación del ahorro energético en la etapa de secado del hidrolizado al realizar la hidrólisis con 100% de subproducto en comparación con la hidrólisis adicionando distintas proporciones de agua sugerida por otros autores (25% y 50%).

Por otro lado, para promover la aplicación de la hidrólisis enzimática como proceso de valorización de los residuos de la industria salmonera, sería ideal el exponer las alternativas de productos de alto valor en el mercado que se pueden elaborar a partir de los distintos hidrolizados. Para esto se propone evaluar funcionalidad tecnológica de los hidrolizados obtenidos con las distintas proteasas evaluadas en el presente estudio y analizar su composición para determinar bioactividades presentes, atributos sensoriales y relacionarlo con las especificidades de las proteasas.

La mayor susceptibilidad proteolítica específica se observó con Flavourzyme 1000L, proteasa con la cual se obtuvieron los mayores valores de concentración de grupos α -amino liberados final ($C_{t=60}$), recuperación de nitrógeno (RN) y grado de hidrólisis (GH). Sin embargo, el costo por unidad de actividad proteolítica para la Flavourzyme 1000L fue el más alto obtenido entre las proteasas evaluadas, al igual que su valor de costo proteasa-rendimiento hidrólisis para todas las concentraciones evaluadas, debido a su alto precio en el mercado. No obstante, resulta interesante estudiar la utilización de una pequeña cantidad de Flavourzyme 1000L en conjunto con la Alcalase 2,4L ya que las distintas especificidades de las dos proteasas podrían resultar en una hidrólisis más extensa, con mayor recuperación de nitrógeno y con menor efecto de inhibición e inactivación enzimática.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abejón, R., Belleville, M., Sanchez-Marcano, J., Garea, A. & Irabien, A. (2018). *Optimal design of industrial scale continuous process for fractionation by membrane technologies of protein hydrolysate derived from fish wastes*. *Sep Purif Technol*, 197, 137-146. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.12.057>
- Adler-Nissen, J. (1979). *Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid*. *J. Agric. Food Chem.*, 27(6), 1256-1262. doi:10.1021/jf60226a042
- Akpınar, O., & Penner, M. (2002). *Peptidase Activity Assays Using Protein Substrates*. *Currents Peptidase Activity Assays Using Protein Substrates*, 3(1), C2.2.1-C2.2.10. Obtenido de <https://doi.org/10.1002/0471142913.fac0202s03>
- Aspevik, T., Egede-Nissen, H. & Oterhals, A. (2016). *A Systematic Approach to the Comparison of Cost Efficiency of Endopeptidases for the Hydrolysis of Atlantic Salmon (Salmo salar) By-Products*. *Food Technol. Biotechnol.*, 54(4), 421-431. doi:10.17113/ft b.54.04.16.4553
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquim Clin Latinoam*, 42(2), 227-236. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10459.1/49268>
- Chabeaud, A., Vandanjon, L., Bourseau, P., Jaouen, P. & Guérard, F. (2009). *Fractionation by ultrafiltration of a saithe protein hydrolysate (Pollachius virens): Effect of material and molecular weight cut-off on the membrane performances*. *J. Food Eng*, 91(3), 408-414. Obtenido de <http://doi.org/10.1016/j.foodeng.2008.09.018>
- Consejo del salmón. (2022). *Consejo del salmón*. Recuperado el 07 de 2022, de Principales datos de la industria: <https://bit.ly/3zwVlxE>
- Coppola, D., Lauritano, C., Palma Esposito, F., Rizzo, C., Riccio, G., & de Pascale, D. (2021). *Fish Waste: From Problem to Valuable Resource*. *Marine Drugs*, 19(2), 116. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/md19020116>
- FAO. (2020). *GLOBEFISH Trade statistics*. Rome: FAO. Obtenido de <https://www.fao.org/3/ca9058en/ca9058en.pdf>
- FAO. (2022). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*. Rome: FAO. Obtenido de <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Fiordo Austral. (2021). *Fiordo Austral: Productos*. Obtenido de <https://fiordoaustral.perception.cl/productos/hidrolizado-salmon/>
- Földesi, B. (11 de 03 de 2019). *Guide to Enzyme Unit Definitions and Assay Design*. Recuperado el 03 de 2023, de Biomol: <https://www.biomol.com/resources/biomol-blog/guide-to-enzyme-unit-definitions-and-assay-design>
- Harnedy, P., & FitzGerald, R. (2012). *Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review*. *Journal of Functional Foods*, 4, 6-24. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.09.001>
- He, S., Franco, S. & Zhang, W. (2013). *Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP)*. *Food Res Int*, 50(1), 289-297. Obtenido de <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.031>

- Jemil , I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Ben Slama-Ben Salem , R., Mehiri, M., . . . Nasri, M. (2014). *Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by Bacillus subtilis A26*. *Process Biochem*, 963-972. doi:<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.004>
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. & Shahidi, F. (2007). *Antioxidative activity and functional properties of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type*. *Food Chem*, 102(4), 1317-1327. Obtenido de <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016>
- Korzeniowska, M., Cheung, I., & Li, E. (2013). *Effects of fish protein hydrolysate and freeze–thaw treatment on physicochemical and gel properties of natural actomyosin from Pacific cod*. *Food Chem.*, 138(2-3), 1967-1975. Obtenido de <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.150>
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (05 de 2000 a). *Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43-81. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.1080/10408690091189266>
- Kristinsson, H., & Rasco, B. (2000 b). *Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (Salmo salar) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture*. *Process Biochemistry*, 36, 131-139. Obtenido de [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00195-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00195-3)
- Landes. (2022). Hidrolizado de salmón: Ficha técnica. Obtenido de <https://landes.cl/wp/wp-content/uploads/2022/04/ficha08-CP-HidrolizadoSalmon.pdf>
- 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(11), 1263-1269. Obtenido de [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00003-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00003-1)
- Márquez-Moreno, M., & Fernandez-Cuadrado, V. (1992). *Enzymic Hydrolysis of Vegetable Proteins: Mechanism and Kinetics*. *Process biochemistry*, 28, 481-490. Obtenido de [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(93\)85032-B](https://doi.org/10.1016/0032-9592(93)85032-B)
- Martínez, O. (2011). Estado actual del aprovechamiento de subproductos de la industria pesquera mediante la obtención de productos de alto valor añadido. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición, Madrid. Obtenido de <https://bit.ly/3z4naMe>
- Merz, M., Eisele, T., Berends, P., Appel, D., Rabe, S., Blank, I., . . . Fischer, L. (2015). *Flavourzyme, an Enzyme Preparation with Industrial Relevance: Automated Nine-Step Purification and Partial Characterization of Eight Enzymes*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(23). doi:10.1021/acs.jafc.5b01665
- Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. (27 de 01 de 2022). *Biblioteca del Congreso Nacional de Chile*. Obtenido de LEY 21410: <http://bcn.cl/2whnv>
- Ministerio del Medio Ambiente. (01 de 06 de 2016). *Biblioteca del Congreso Nacional de Chile*. Obtenido de LEY 20920: <http://bcn.cl/2qkbb>
- Mowi. (2019). *Salmon Farming Industry Handbook*. Recuperado el 20 de 07 de 2022, de <https://ml.globenewswire.com/Resource/Download/1766f220-c83b-499a-a46e-3941577e038b>

- Nasri, M. (2017). *Protein Hydrolysates and Biopeptides: Production, Biological Activities, and Applications in Foods and Benefits*. A review. *Adv Food Nutr Res.*, 81, 109-159. doi:<https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.10.003>
- Nelson, D., & Cox, M. (2005). *Principios de bioquímica de Lehninger*, 4ta edición. Barcelona: Omega.
- Nesse, K., Nagalakshmi, A., Marimuthu, P., Singh, M., Bhetariya, P., Ho, M., & Simon, R. (2014). *Safety evaluation of fish protein hydrolysate supplementation in malnourished children*. *Regul Toxicol Pharm*, 69(1), 1-6. Obtenido de <http://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.02.009>
- Nielsen, P., Petersen, D. & Dambmann, C. (2001). *Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis*. *Journal of Food Science*, 66(5), 642-646. doi:10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x
- Novozymes. (2002). *Flavourzyme Product Sheet*. Denmark. Obtenido de <https://pdf4pro.com/amp/view/product-sheet-ebiosis-318591.html>
- Novozymes. (2002). *Neutrase Product Sheet*. Recuperado el 2023, de <https://pdf4pro.com/view/product-sheet-ebiosis-67ae1.html>
- Novozymes. (2021). *Alcalase: Product features, details and benefits*. Recuperado el 03 de 2023, de <https://www.novozymes.com/en/products/animal-protein/alcalase>
- Novozymes. (2022). *Protamex: Product features, details and benefits*. Obtenido de <https://www.novozymes.com/en/products/animal-protein/protamex-animal-protein>
- Pasupuleti, V. K., & Braun, S. (2010). *State of the art manufacturing of protein hydrolysates*. En *Protein Hydrolysates in Biotechnology* (págs. 11-32). doi:10.1007/978-1-4020-6674-0_2
- Pedroche, J., Yust, M., Lqari, H., Megias, C., Giron-Calle, J., Alaiz, M., . . . Millán, F. (2007). *Obtaining of Brassica carinata protein hydrolysates enriched in bioactive peptides using immobilized digestive proteases*. *Food Research International*, 40(7), 931-938. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.04.001>
- Petrova, I., Tolstorebrov, I. & Eikevik, T. (2018). *Production of fish protein hydrolysates step by step: technological aspects, equipment used, major energy costs and methods of their minimizing*. *Int Aquat Res*, 10, 223-241. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s40071-018-0207-4>
- Qi, W., & He, Z. (2006). *Enzymatic hydrolysis of protein: mechanism and kinetic model*. *Front. Chem. China*, 3, 308-314. doi:10.1007/s11458-006-0026-9
- Sabadin, I., Villas-Boas, M., Zollner, R. & Netto, M. (2012). *Effect of combined treatment of hydrolysis and polymerization with transglutaminase on b-lactoglobulin antigenicity*. *Eur Food Res Technol*, 235(5), 801-809. doi:10.1007/s00217-012-1802-z
- Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M. & Amar, R. (2014). *Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: impact on interesting peptides fractions and nutritional properties*. *Food Res Int*, 65, 453-461. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.026>
- Scopes, R. (2002). *Enzyme Activity and Assays*. En John Wiley & Sons, *Encyclopedia of Life Sciences* (págs. 1-6). Macmillan Publishers Ltd. doi:10.1038/npg.els.0000712

- Seafood from norway. (s.f.). salmón, el "superalimento" . Recuperado el 06 de 08 de 2021, de <https://salmon.fromnorway.com/es/norwegian-salmon/salmon-the-superfood/>
- SERNAPESCA. (2021). Manual de Normativa de Mortalidades Masivas. Recuperado el 02 de 2022, de http://www.sernapesca.cl/sites/default/files/manual_normativa_mortalidades_masivas_28-01-2021_v2.pdf
- Sernapesca. (2022). Anuario Estadístico de Pesca y Acuicultura 2021. Recuperado el 07 de 2022, de Series cronológicas 2011-2021: <https://bit.ly/3cx2bdi>
- Sernapesca. (2022). Anuarios estadísticos de pesca y acuicultura 2018-2021. Obtenido de Materia prima y producción: <https://bit.ly/3cx2bdi>
- Sernapesca. (07 de 07 de 2022). Manual de Inocuidad y Certificación. Santiago. Recuperado el 07 de 2022, de Control de Procesos: <https://bit.ly/3S2q8JR>
- Sernapesca. (2022). Reporte desembarque total 2021. Obtenido de <https://bit.ly/3z6Nd5n>
- Shahidi, F., Hang, X. & Synowiecki, J. (1995). *Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (Mallotus villosus)*. *Food Cheminty*, 53, 285-293. Obtenido de [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)93934-J](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)93934-J)
- Singh, A., Benjakul, S. & Huda, N. (2020). *Characteristics and nutritional value of biscuits fortified with debittered salmon (Salmo salar) frame hydrolysate*. *Int. J. Food Sci. Technol*, 55, 3553-3562. Obtenido de <https://doi.org/10.1111/ijfs.14688>
- Skanderby, M. (1994). *Protein hydrolysates: their functionality and applications*. *Food Technol. Int. Eur.*, 10(141).
- Urakova, I. N., Pozharitskaya, O. N., Demchenko, D. V., Shikov, A. & Makarov, V. G. (2012). *The biological activities of fish peptides and methods of their isolation*. *Russ. J. Mar. Biol.*, 38, 417-422. Obtenido de <https://doi.org/10.1134/S1063074012060090>
- Valdivia , S. (2021). Evaluación de la hidrólisis enzimática de proteínas de esquelón de salmón a diferentes proporciones de subproducto/agua y distintos regímenes de pH. Universidad Técnica Federico Santa María, Depto. de Ingeniería Química y Ambiental, Valparaíso.
- Valencia, P., Espinoza, K., Ceballos, A., Pinto, M. & Almonacid, S. (2015). *Novel modeling methodology for the characterization of enzymatic hydrolysis of proteins*. *process biochemistry*, 50, 589-597.
- Valencia, P., Pinto , M. & Almonacid, S. (2014). *Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase*. *Process Biochemistry*, 49(2), 258-264. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.11.012>
- Valencia, P., Solis , T., Rojas, P., Ibañez , F., Astudillo-Castro, C., Pinto, M., & Almonacid, S. (2019). *Proteolytic susceptibility of food by-product proteins: An evaluation by means of a quantitative index*. *Process Biochemistry*, 77, 63-69. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.11.009>
- Valencia, P., Valdivia, S., Nuñez, S., Reza, O., Pinto, M., Ramirez, C., . . . Almonacid, S. (2021). *Assessing the Enzymatic Hydrolysis of Salmon Frame Proteins through Different By-Product/Water Ratios and pH Regimes*. *Foods*, 10, 3045. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/foods10123045>
- Vera, O. (2016). Evaluación económica de la operación de un reactor enzimático para la hidrólisis de proteínas de subproductos de la industria pesquera. UTFSM, Valparaíso.

- 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 skin*. *Food Chemistry*, 104, 1698-1704. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.044>
- Yamamoto . (08 de 2019). *Yamamoto nutrition: AlphaTech Podwer* . Obtenido de https://www.yamamotonutrition.com/esp/alphatech_powder_pr31466
- Zapata, J., & Gutiérrez, C. (2017). Hidrolizados de pescado - Producción, beneficios y nuevos avances en la industria. - Una revisión. *Agroindustria y Ciencia de los Alimentos*, 66(3), 311-322. Obtenido de <https://doi.org/10.15446/acag.v66n3.52595>
- Zhang, X., Dai, Z., Zhang, Y., Dong, Y. & Hu, X. (2022). *Structural characteristics and stability of salmon skin protein hydrolysates obtained with different proteases*. *LTW - Food Science and Technology*, 153, 112460. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112460>
- Zhou, H., Wang, C., Ye, J., Tao, R., Chen, H., & Cao, F. (2016). *Effects of Enzymatic Hydrolysis Assisted by High Hydrostatic Pressure Processing on the Hydrolysis and Allergenicity of Proteins from Ginkgo Seeds*. *Food Bioprocess Technol*, 9(5), 835-848. doi:10.1007/s11947-016-1676-3

ANEXOS

Anexo A: Ensayo de actividad proteolítica con azocaseína

- Equipos

Tabla 13. Equipos para realización de ensayo con azocaseína. Elaboración propia.

Equipos utilizados		
Etapa	Equipo	Marca, Modelo
Preparación azocaseína 1,0%	Balanza Analítica	Sartorius, PRACTUM224-1S
	Agitador magnético con placa calefactora	JKI, JK-DMS-HS
Ensayo	Baño seco	Labnet, D1200
	Agitador vortex	VELP, ZX3
Separación de fases	Centrífuga eppendorf	Labnet Prism, C2500
Cuantificación	Espectrofotómetro	Thermo Scientific, Orion AquaMate 8000

- Soluciones y reactivos
 - Azocaseína (CAS 102110-74-7)
 - Solución tampón sodio fosfato 50mM pH 7,5
 - Acido tricloroacético (TCA) 10% (v/v)
 - Solución NaOH 1N.
- Preparación Azocaseína 1,0% (m/v)
 - Pesar 1,00 [g] de azocaseína en balanza analítica.
 - Disolver la azocaseína en 100 [mL] de solución tampón sodio fosfato (50mM, pH 7,5) con agitación y calefacción a 50°C.
 - Dividir en porciones y almacenar congelado en caso de no usarse inmediatamente.
- Procedimiento ensayo
 - En el baño seco a 50°C incubar 1,0 [mL] de azocaseína 1,0% (m/v) en tubo eppendorf de 2 [mL].
 - Añadir 100 [µL] de solución de proteasa previamente diluida y agitar en vortex.
 - Volver al baño seco e incubar por 10 [min].
 - Detener reacción agregando 1,0 [mL] de TCA 10%, agitar en vortex.
 - Separar fases centrifugando a 8000 RCF por 6 min
 - Mezclar 1,0 [mL] de sobrenadante con 1,0 [mL] de NaOH 1N
 - Medir Absorbancia a 440 nm.
 - Para el blanco incubar 1,0 [mL] de azocaseína 1,0% (m/v) por 10 min, agregar 1,0 [mL] de TCA 10% y luego agregar los 100 [µL] de solución de proteasa diluida.

- Hacer ensayo en duplicado o triplicado.

- **Consideraciones para el ensayo**

Para obtener la actividad proteolítica en las unidades correspondientes del ensayo, es necesario primero obtener la curva que se forma al graficar absorbancia vs cantidad de enzima. Esta curva presenta una primera parte lineal, la pendiente de esta corresponderá a la actividad proteolítica específica de la enzima en el ensayo por lo que será de nuestro interés obtener la parte lineal de la curva. Para construir la curva absorbancia versus cantidad de enzima y determinar correctamente la pendiente de la parte lineal, se necesitará repetir el ensayo con al menos 4 diluciones distintas de proteasa.

Se realizan ensayos preliminares para determinar las diluciones a utilizar de forma que se obtenga la parte lineal de la curva y además que se obtenga una absorbancia medible a 440 nm entre 0,999 y 0,100.

- **Unidad actividad proteolítica [U] y actividad específica [U/g]**

Se define la unidad de actividad proteolítica del ensayo con azocaseína U como la cantidad de proteasa que produce un cambio en 1,0 unidad de absorbancia medida a 440 nm en cubeta de 1 [cm], por minuto de reacción bajo las condiciones del ensayo con azocaseína (azocaseína 1% (m/v), pH 7,5, 50°C por 10 min).

Teniendo en cuenta esta definición, el valor de la actividad proteolítica específica en función de los gramos de preparado comercial de proteasas (unidades [U/g enz]) se obtuvo calculando la pendiente de la curva de actividad [U/mL ensayo] frente concentración de enzima [g enz/mL ensayo] verificando la linealidad de la curva obtenida. Donde la actividad en unidades [U/mL ensayo] de cada ensayo (i) se obtiene según la ecuación (9.1.1).

$$Actividad (i) \left[\frac{U}{mL \text{ ensayo}} \right] = \frac{Abs \ 440nm (i) - Abs \ 440nm(blanco)}{10 [min]} \quad (9.1.1)$$

Anexo B: Diluciones enzimas para ensayos con azocaseína

Tabla 14. Diluciones de enzima utilizadas para los ensayos de actividad con azocaseína.

ENZIMA	ENSAYO				
Alcalase 2,4L	B	1	2	3	4
Dilución	-	5000	4000	3000	2000
Cantidad enzima [mg]	0	0,023	0,029	0,039	0,058
Neutrase 0,8L	B	1	2	3	4
Dilución	-	1500	1000	500	400
Cantidad enzima [mg]	0	0,084	0,127	0,253	0,317
Flavourzyme 1000L	B	1	2	3	4
Dilución	-	1500	1000	500	250
Cantidad enzima [mg]	0	0,085	0,127	0,254	0,508
Protamex	B	1	2	3	4
Dilución	-	2000	1200	1000	500
Cantidad enzima [mg]	0	0,050	0,083	0,100	0,200

Anexo C: Volumen enzimas para ensayos con esquelón de salmón

Tabla 15. Volumen de proteasas utilizadas para los ensayos de actividad con esquelón de salmón.

ENZIMA	ENSAYO				
Alcalase 2,4L	1	2	3	4	5
Volumen enzima dil 1:100 [uL]	50,0	100,0	125,0	166,6	250,0
Concentración enzima [g/mL]	1,16E-05	2,32E-05	2,90E-05	3,86E-05	5,78E-05
Neutrase 0,8L	1	2	3	4	5
Volumen enzima dil 1:50 [uL]	100,0	156,2	250,0	500,0	625,0
Concentración enzima [g/mL]	5,05E-05	7,89E-05	1,26E-04	2,51E-04	3,13E-04
Flavourzyme 1000L	1	2	3	4	5
Volumen enzima dil 1:100 [uL]	100,0	166,6	250,0	500,0	1000,0
Concentración enzima [g/mL]	2,00E-05	3,32E-05	4,98E-05	9,90E-05	1,96E-04
Protamex	1	2	3	4	5
Volumen enzima dil 1:100 [uL]	125	250	417	500	1000
Concentración enzima [g/mL]	2,49E-05	4,98E-05	8,27E-05	9,90E-05	1,96E-04
Autólisis (sin enzima)	0				
Concentración enzima [g/mL]	0				

Anexo D: Procedimiento Hidrólisis Total

Soluciones y reactivos

- NaOH 6M
- HCl 6M

Dilución de la muestra

Para todos los experimentos presentados en este trabajo se utiliza una dilución previa de la muestra de 1:50.

Procedimiento

- Colocar 2 mL de HCl 6M en un tubo de vidrio con tapa hermética.
- Agregar 100 µL de muestra previamente diluida al tubo, agitar en vortex y cerrar.
- Llevar al baño seco a 110°C por 24 horas.
- Retirar del baño seco y llevar a temperatura ambiente.
- Agregar 2 mL de NaOH 6N, cerrar y agitar en vortex.
- La hidrólisis total se encuentra lista para realizar la cuantificación de grupos alfa-amino libres con método OPA, sin necesidad de diluir nuevamente.

Anexo E: Procedimiento Método OPA

Soluciones y reactivos

- Borato de sodio decahidratado (**Borax**)
- dodecilsulfato de sodio (**SDS**)
- orto-ftaldehído (**OPA**)
- ditioneitol (**DTT**)

Preparación del reactivo OPA

Para preparar 200 [mL] de reactivo OPA primero se pesan 7,620[g] de Borax y 0,200[g] de SDS y se disuelven en 150[mL] de agua destilada en vaso precipitado de 500[mL] (con agitación y 50°C). En paralelo disolver 0,160 [g] de OPA en 4 [mL] de etanol absoluto. Trasvasiar el OPA disuelto a la mezcla de Botax-SDS (enjuagando con agua destilada) y agregar 0,176 [g] de DTT. Una vez disuelta la mezcla se afora a 200 [mL] con agua destilada (Nielsen, et al., 2001). Almacenar en frasco oscuro con tapa y protegido de la luz. La duración del reactivo es de una semana aproximadamente.

Procedimiento

Se mezclan 0,200 [mL] de muestra previamente diluida (ver dilución de la muestra) con 1,5 [mL] del reactivo OPA en celda de vidrio. Se cronometra 2 min exactos y se registra la lectura de absorbancia a 340nm. El blanco se prepara con agua destilada en vez de muestra. La curva de calibrado se prepara con estándares de soluciones de serina de 20, 40, 60, 80, 100 [mg/L], obteniéndose una curva con ajuste lineal tal como la presentada en la [Figura 31](#). La ecuación obtenida del ajuste lineal de dicha curva se utiliza para calcular la concentración de grupos alfa amino a partir de la absorbancia. Es importante realizar una nueva curva de calibrado justo antes de comenzar la medición de las muestras y cada vez que se cambie la partida de reactivo OPA.

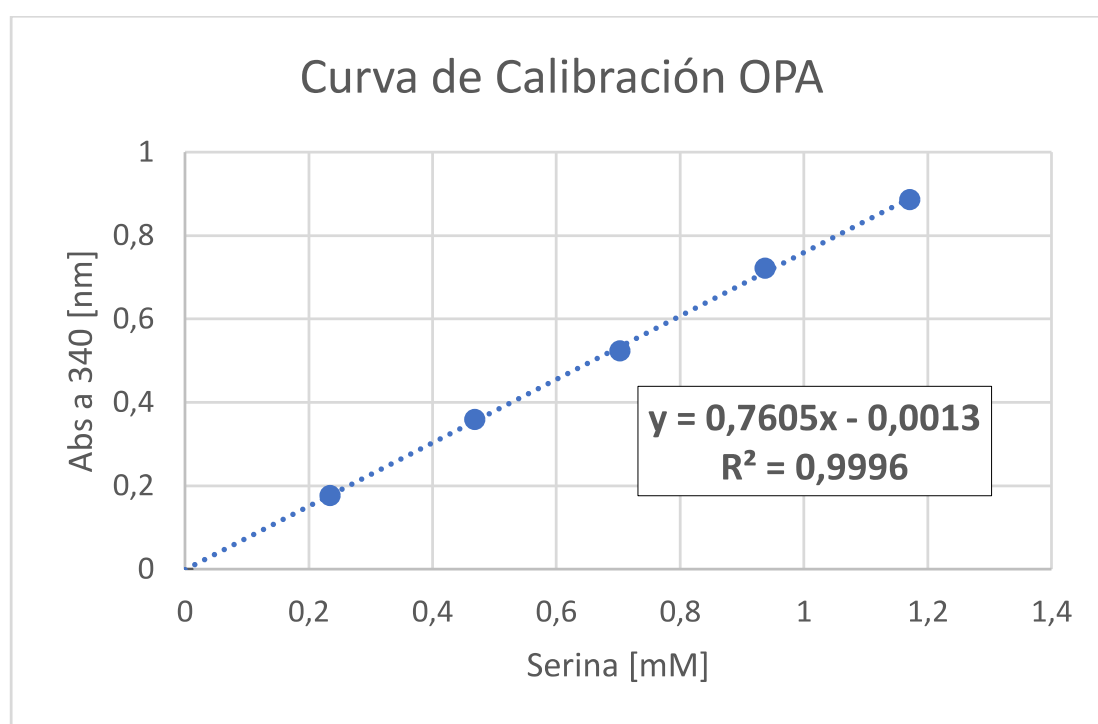


Figura 31. Curva de calibración para método OPA. Datos y Elaboración Propios.

Dilución de la muestra

El análisis de las muestras tomadas durante el transcurso de la hidrólisis Alc-3, Fla-2 y Fla-3, se realiza con diluciones de 1:50 para los tiempos de reacción $t=0$, 1, 2 min, y diluciones de muestra de 1:100 para los tiempos de reacción $t= 5, 10, 20, 30, 40, 50$ y 60 min.

El análisis del resto de los experimentos de hidrólisis (Alc-1, Alc-2, Neu-1, Neu-2, Neu-3, Fla-1, Prota-1, Prota-2 y Prota-3) se realiza con diluciones de 1:50 para los tiempos de reacción $t=0$, 1, 2, 5 min, y diluciones de muestra de 1:100 para los tiempos de reacción $t= 10, 20, 30, 40, 50$ y 60 min.

Anexo F: Prueba de significancia de parámetros del modelo logarítmico

Tabla 16. Valores y resultados de la prueba de significancia de parámetros *a* y *b* del modelo logarítmico, ajustados a los datos experimentales de la hidrólisis de esquelón de salmón. Elaboración propia.

Experimento	Parámetro <i>a</i>			Parámetro <i>b</i>		
	Error estándar ¹	<i>t</i> ₀	Resultado significativo ²	Error estándar ¹	<i>t</i> ₀	Resultado significativo ²
Alc-1	1,4562	5,903	Si	0,0028	7,908	Si
Alc-2	5,8790	4,618	Si	0,0029	10,419	Si
Alc-3	4,2367	6,203	Si	0,0018	12,679	Si
Prota-1	2,1125	10,529	Si	0,0012	20,794	Si
Prota-2	3,0234	6,289	Si	0,0017	10,601	Si
Prota-3	5,7005	6,083	Si	0,0015	12,961	Si
Neu-1	2,1432	5,055	Si	0,0033	7,915	Si
Neu-2	6,0407	3,904	Si	0,0030	7,843	Si
Neu-3	1,4090	9,286	Si	0,0012	12,594	Si
Fla-1	1,8745	6,735	Si	0,0017	9,065	Si
Fla-2	4,4083	5,009	Si	0,0016	7,880	Si
Fla-3	5,6731	5,006	Si	0,0012	7,499	Si
Autolisis	3,5050	1,017	No	0,1235	2,505	Si

¹: Error estándar corresponde al resultado de la expresión $\sqrt{\sigma^2 C_{jj}}$ presentada en Antecedentes.

²: La prueba se realiza con un nivel de significancia del 5% (95% de confianza) con número de experimentos (n) igual a 10 y número de parámetros (p) igual a 2, esto es $t_{(0,05;8)}= 2,365$.

Anexo G: Datos experimentales caracterización del hidrolizado

Tabla 17. Datos experimentales usados para caracterización de los hidrolizados de esquelón de salmón obtenidos a los 60 min de reacción. Condiciones de reacción: 100% esquelón de salmón, 50°C, pH nativo y sin control, concentraciones de enzima de: 1) 5,2; 2) 10,4; y 3) 20,8 [*U_s/g esq*]. Elaboración propia.

Exp.	FS [%]	<i>C</i> _(<i>H.total</i>) [mM]	RN [%]	<i>C. alfa amino libres</i> _{<i>t</i>=0} [mM]	<i>C</i> _(<i>t</i>=60 min) [mM]	GH [%]
Alc-1	29,08 ± 0,32	1414,65 ± 37,03	22,75 ± 0,59	50,29 ± 5,58	122,02 ± 7,19	1,98 ± 0,09
Alc-2	30,28 ± 0,26	1440,24 ± 5,05	24,11 ± 0,13	44,75 ± 5,15	139,48 ± 4,32	2,35 ± 0,05
Alc-3	27,31 ± 1,36	1621,02 ± 37,03	24,50 ± 1,78	47,65 ± 4,80	164,70 ± 4,87	2,50 ± 0,05
Prota-1	25,66 ± 0,85	1516,46 ± 63,34	21,52 ± 1,18	43,05 ± 0,13	147,26 ± 2,00	2,10 ± 0,04
Prota-2	24,35 ± 0,18	1613,45 ± 69,27	21,72 ± 1,09	41,32 ± 1,43	183,22 ± 2,93	2,48 ± 0,06
Prota-3	26,06 ± 0,69	1703,18 ± 63,34	24,56 ± 1,56	44,16 ± 4,21	200,51 ± 7,76	2,91 ± 0,04
Neu-1	20,32 ± 0,22	1504,50 ± 18,71	16,90 ± 0,03	52,01 ± 4,08	120,42 ± 7,70	1,36 ± 0,10
Neu-2	25,31 ± 0,55	1528,65 ± 17,69	21,39 ± 0,71	42,57 ± 2,05	156,99 ± 1,31	2,21 ± 0,03
Neu-3	25,32 ± 0,31	1661,69 ± 15,31	23,26 ± 0,07	58,03 ± 2,95	176,41 ± 6,37	2,49 ± 0,06
Fla-1	30,86 ± 0,25	1612,35 ± 56,48	27,49 ± 0,74	49,95 ± 1,70	172,03 ± 3,51	2,96 ± 0,04
Fla-2	29,06 ± 0,88	1666,79 ± 99,35	26,73 ± 0,78	45,49 ± 2,57	241,33 ± 4,17	3,91 ± 0,19
Fla-3	32,62 ± 1,13	1781,79 ± 50,36	32,16 ± 2,02	46,66 ± 6,18	335,29 ± 24,99	6,09 ± 0,24