UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL

VALPARAÍSO – CHILE

"HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNA DE RESIDUO DE MERLUZA A ALTA CONCENTRACIÓN DE SÓLIDOS SIN CONTROL DE pH"

MAURO ARIEL SAAVEDRA CASTRO

MEMORIA DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE

INGENIERO CIVIL QUÍMICO

PROFESOR GUÍA

DR. PEDRO VALENCIA ARAYA

PROFESOR GUÍA

DR. SERGIO ALMONACID MERINO

PROFESOR CORREFERENTE

DR. RICARDO SIMPSON RIVERA

NOVIEMBRE – 2016

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar mis agradecimientos a mis padres Ivette y Víctor quienes siempre estuvieron siempre presentes y que de no ser por ellos y su constante esfuerzo no estaría hoy donde estoy. A mi mami Sonia quien desde siempre ha entregado todo para mi bienestar. Agradecer también a mi Tata David y a mi Abuelita Helena. A Omar por quererme como un hijo desde niño y regalarme a mis hermanos Gonzalo, Nadia y Antonella a quienes amo y llenaron mi vida de felicidad.

Quiero agradecer Nicole a quien ha sido mi compañera durante toda esta aventura y más, y espero de todo corazón que sigamos sumando muchos logros juntos y cumplamos todos los planes e ideas locas que nos hemos propuesto.

Agradecer a mi perrito plaps Diego con quien nos resacamos la mierda estudiando desde el principio, a mis papitas Javiera y Jorge por aguantarme todas mis estupideces y por qué la distancia no ha sido impedimento para nuestra amistad, a Paula por toda la ayuda y amistad y a quien el título de "la mejor" le queda chico, a la negra Andrea, al Nicolás y a la Claudia por su constante ayuda y amistad, y en general a todas las personas que compartieron conmigo esta etapa universitaria.

Agradecer a Pedro por todo lo aprendido durante este tiempo, por su confianza y especialmente por su amistad. Agradezco también a mis compañeros de laboratorio por formar un excelente grupo de trabajo y por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

Agradezco también a mis amigos que siempre me acompañaron desde el principio de este proceso Aldo, Manuel, Marcela y Paulina.

Finalmente doy mis agradecimientos por el financiamiento otorgado para el desarrollo de esta memoria al proyecto Fondecyt Regular 1121147 "Attaining Low-Salt Shelf-Stable foods through injection of By-products protein hydrolysate: Effect on drained weight, quality and overall productivity of Pouch-Packed", Conicyt. Y al proyecto Fondecyt regular 1161293 "Enzymatic membrane reactor for the hydrolysis of fish by-product proteins", Conicyt.

RESUMEN

Como consecuencia de la actividad pesquera y acuícola en Chile y en el mundo, se genera una gran cantidad de subproductos, los cuales actualmente están siendo descartados o convertidos en productos de bajo valor agregado. La hidrólisis enzimática de las proteínas presentes en estos subproductos genera un producto con un valor agregado debido a que se forman péptidos con propiedades bioactivas que resultan de gran interés para la industria alimentaria.

La hidrólisis enzimática de proteína en la industria del pescado es una actividad relativamente nueva, la cual se lleva a cabo generalmente mezclando la materia prima con agua una razón de 1:1 en conjunto con la adición de enzimas las cuales son responsables de la reacción. El objetivo de esta investigación, es estudiar la factibilidad de llevar a cabo hidrólisis de residuos de merluza trabajando con altas concentraciones de sólidos, sin controlar el pH durante la reacción, postulando que esto podría ser beneficioso para disminuir los costos del proceso. La enzima utilizada es la Subtilisina, cuya fuente es el preparado comercial Alcalase.

La metodología consistió en realizar experimentos de hidrólisis enzimática a diferentes condiciones de operación determinadas por un diseño factorial CCC, cuyos factores son la concentración inicial de proteína, temperatura y concentración inicial de enzima, el diseño contempla trabajar con residuos de pescado en una proporción 1:1 con agua hasta la utilización de sólo residuo. Los resultados obtenidos relacionan mediante la metodología de superficie de respuesta, la cantidad de grupos α-aminos ácidos en función de las condiciones de operación. Además, se estudió el porcentaje de extracción de nitrógeno, fracción soluble y comparación de tratamientos bajo distintas condiciones de pH y de concentración inicial de proteína.

Los resultados indican que el porcentaje de extracción de nitrógeno alcanzado depende principalmente de la concentración inicial de proteína y la concentración inicial de enzima. Además, la fracción soluble obtenida se relaciona linealmente con la concentración inicial de proteína utilizada. Los resultados además señalan que realizar hidrólisis de residuo de merluza a pH 8 constante o pH inicial 8, entrega una liberación de grupos α-amino ácidos 22-29% mayor que en el caso de no controlar el pH durante la reacción de hidrólisis después de 60 minutos.

Se concluyó que es posible realizar hidrólisis enzimática de residuos de merluza cuando se utilizan altas concentraciones de sólido y sin control de pH, reduciendo además la cantidad de energía necesaria para el secado del sobrenadante obtenido post-hidrólisis. Sin embargo, el producto obtenido a diferentes condiciones de operación no posee el mismo grado de hidrólisis y, por lo tanto, sus propiedades funcionales pueden no serán mismas.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS ..... **I**

RESUMEN ..... **II**

1. INTRODUCCIÓN **2**

2. OBJETIVOS **7**

2.1 Objetivo General 7

2.2 Objetivos específicos 7

3. ANTECEDENTES **9**

3.1 Industria pesquera y acuícola mundial. 9

3.1 Industria pesquera y acuícola nacional. 11

3.1.1 Desembarque nacional 11

3.1.2 Distribución del desembarque nacional 13

3.1.3 Destino del desembarque 16

3.1.4 Generación de residuos de la industria 17

3.2 Propiedades funcionales de los alimentos 18

3.3 Hidrolisis de proteínas 20

3.3.1 Hidrolisis química 20

Hidrólisis ácida 21

Hidrólisis alcalina 21

3.3.2 Hidrólisis Bioquímica 21

Hidrólisis auto lítica o autolisis de pescado 22

Hidrólisis de pescado por adición de enzimas 23

3.3.3 Hidrolizados proteicos 24

3.4 Grado de hidrólisis 25

3.4.1 Método basado en la valoración del protón: pH-stat 26

3.4.2 Método de cuantificación de DH mediante TNBS 26

3.4.3 Método de cuantificación de DH mediante OPA 27

3.5 Modelamiento matemático de la reacción de hidrólisis 28

3.5.1 Mecanismo de reacción y modelo cinético 30

3.6 Metodología de superficie de respuesta 34

3.6.1 Diseño de Experimentos 35

Diseño Central compuesto 36

4. METODOLOGÍA 39

4.1 Equipos 41

4.2 Materiales y Reactivos 42

4.2.1 Sustrato 42

4.2.2 Enzima 42

4.3 Diseño del Reactor 43

4.4 Experimentos de hidrólisis enzimática 43

4.4.1 Preparación de sustrato 43

4.4.2 Hidrolisis de sustrato 44

4.4.3 Diseño de experimento 44

4.4.4 Obtención de Curvas de Hidrólisis. 45

4.4.5 Primer nivel de modelamiento 46

Estimación de parámetros a y b. 46

4.4.6 Segundo nivel de modelamiento 47

Metodología de superficie de respuesta MSR 47

Regresión para MSR 47

Prueba de hipótesis en la regresión múltiple 49

Prueba de significación de la regresión 50

Pruebas de los coeficientes de regresión individuales 52

Verificación de la adecuación del modelo 55

4.5 Determinación de Porcentaje de extracción de nitrógeno..... 55

4.6 Comparación de tratamientos de pH..... 56

4.7 Comparación de Energía de secado y eficiencia de productividad. 57

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 61

5.1 Hidrólisis enzimática 61

5.1.1 Primer nivel de modelamiento 64

5.1.2 Segundo nivel de modelamiento 70

Prueba de significancia de la regresión..... 72

Resultados de la regresión 73

Verificación de la adecuación del modelo 79

Valores de predicción de los modelos 82

5.2 Extracción de Nitrógeno. 84

Fracción soluble 84

Porcentaje de Extracción de Nitrógeno 85

5.1 Comparación de tratamientos de pH..... 93

5.2 Comparación de Energía de Secado 98

Caso 1: Comparación de tratamientos a distinta concentración de sustrato 98

Caso 2: Comparación de tratamientos a distintas condiciones de pH. 101

6. CONCLUSIONES..... 104

7. REFERENCIAS 106

8. ANEXOS..... 111

8.1 Protocolos de análisis de muestras..... 111

8.1.1 Preparación de reactivo OPA 111

8.1.2 Preparación de estándar de Serina 111

8.1.3 Análisis OPA para determinación de grupos aminos libres. 112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Producción mundial de pesqueras y acuicultura (millones de toneladas). 9
Figura 3.2. Utilización mundial de pesca y suministro..... 10
Figura 4.1. Esquema de etapas de la metodología de experimentación..... 40
Figura 4.2. Montaje para los experimentos de hidrólisis..... 41
Figura 4.3. Esquema de las dimensiones de Reactor y Agitador 43
Figura 4.4. Ejemplo de curva hidrólisis 46
Figura 4.5. Algoritmo de obtención del modelo 54
Figura 4.6. Correlación entre el tamaño promedio de proteína y el grado de hidrólisis. 58
Figura 5.1. Correlación entre diferencia de pH en respecto
del DH% y de los grupos aminos formados. 63
Figura 5.2. Curvas de hidrólisis donde se muestran los grupos alfa-amino
en función del tiempo 64
Figura 5.3. Curvas de hidrólisis donde se muestran los grupos alfa-amino
en función del tiempo..... 65
Figura 5.4. Curvas de hidrólisis donde se muestran los grupos alfa-amino
en función del tiempo..... 66
Figura 5.5. Curvas de hidrólisis donde se muestran los grupos alfa-amino
en función del tiempo..... 67
Figura 5.6 Curvas de hidrólisis donde se muestran los grupos alfa-amino
en función del tiempo..... 68
Figura 5.7. Superficie de Respuesta para a' en función de E y T para S=-1. 73
Figura 5.8. Superficie de Respuesta para a' en función de E y T para S=0..... 74
Figura 5.9. Superficie de Respuesta para a' en función de E y T para S=1..... 74
Figura 5.10. Superficie de Respuesta para a' en función de E y S para T=-1. 75
Figura 5.11. Superficie de Respuesta para a' en función de E y S para T=0..... 75
Figura 5.12. Superficie de Respuesta para a' en función de E y S para T=1..... 76
Figura 5.13. Superficie de Respuesta para b' en función de S y T. 77
Figura 5.14. Gráfica de probabilidad normal los residuos del modelo de respuesta de a'. ... 79
Figura 5.15. Gráfica de residuales vs valores ajustados $\boldsymbol{yi}$ para el parámetro a'..... 80

Figura 5.16. Gráfica de probabilidad normal los residuos del modelo de respuesta de b'. ... 80
Figura 5.17. Gráfica de residuales vs valores ajustados $\boldsymbol{yi}$ para el parámetro b'..... 81
Figura 5.18. Correlación entre b' experimental y b' predicho. 83
Figura 5.19. Correlación entre fracción soluble obtenida después de 60 minutos de reacción y concentración inicial de proteína utilizada. 85
Figura 5.20. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de S y T para E=-1. 87
Figura 5.21. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de S y T para E=0..... 88
Figura 5.22. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de S y T para E=1..... 88
Figura 5.23. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de E y T para S=-1. 89
Figura 5.24. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de E y T para S=0..... 89
Figura 5.25. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de E y T para S=1..... 90
Figura 5.26. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de E y S para T=-1. 90
Figura 5.27. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de E y S para T=0..... 91
Figura 5.28. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de E y S para T=1..... 91
Figura 5.29. Curvas de hidrólisis donde se muestran los grupos alfa-amino en función del tiempo para los experimentos bajo distintas condiciones de pH..... 93
Figura 5.30. Cambio de pH en función del tiempo para los experimentos a condiciones de pH 94
Figura 5.31. Distribución porcentual de costos para hidrólisis enzimática de residuos de pescado. 100
Figura 8.1. Curva de calibración para reacción de Serina con OPA. 112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Producción mundial y utilización. 10
Tabla 3.2. Mayores productores por pesca extractiva mundial. 11
Tabla 3.3. Mayores productores acuícolas mundial. 12
Tabla 3.4. Utilización del desembarque total nacional de peces..... 16
Tabla 3.5. Utilización del desembarque total nacional en toneladas. 16
Tabla 3.6. Composición promedio de un ejemplar de bacalao 17
Tabla 3.7. Mortalidad de salmónidos destinados a plantas reductoras en 2015. 18
Tabla 3.8. Expresiones de los parámetros a y b para la ecuación exponencial. 33

Tabla 3.9. Expresiones de los parámetros a' y b' para la ecuación exponencial. 34
Tabla 4.1. Listado de equipos utilizados 41
Tabla 4.2. Composición de residuos de merluza 42
Tabla 4.3. Factores y niveles de operación según diseño de experimento CCC. 44
Tabla 4.4. Diseño de Experimento CCC y valores de los factores. 45
Tabla 4.5. Análisis de varianza de la significación de la regresión múltiple..... 51
Tabla 4.6. Experimentos para comparación de grupos α-aminos liberados
bajo distintas condiciones de pH. 57
Tabla 5.1. Grupos aminos libres y grado de hidrólisis
después de 60 minutos de reacción. 61
Tabla 5.2. Diferencia entre pH inicial y final después de 60 minutos de reacción. 62
Tabla 5.3. Valores de a’, b’ y R^2 para los ajustes de la ecuación logarítmica
a las curvas de hidrólisis del diseño CCC. 69
Tabla 5.4. Coeficientes de la MSR para el parámetro a' 71
Tabla 5.5. Coeficientes de la MSR para el parámetro b'. 71
Tabla 5.6. Análisis de varianza y coeficiente de determinación
múltiple de la regresión de a'. 72
Tabla 5.7. Análisis de varianza y coeficiente de determinación
múltiple de la regresión de b' 72
Tabla 5.8. Parámetros del modelo logarítmico experimental y modelo ajustado. 82
Tabla 5.9. Fracción soluble después de 60 minutos de hidrólisis. 84
Tabla 5.10. Extracción de nitrógeno y grado de hidrólisis alcanzada
después de 60 minutos de reacción para cada tratamiento. 86
Tabla 5.11. Análisis de varianza y coeficiente de determinación múltiple
de la regresión de porcentaje de extracción de nitrógeno..... 87
Tabla 5.12. Comparación de tratamientos a distintas condiciones de pH. 95
Tabla 5.13. Resultados de comparación de tratamientos 96
Tabla 5.14. Valores de parámetros experimentales a', b' y
error estándar asociado al parámetro. 96
Tabla 5.15. Resultados comparación de parámetros del modelo logarítmico. 97
Tabla 5.16. Comparación de energía y productividad a diferentes condiciones de S
después de 60 minutos de reacción. 99

Tabla 5.17. Comparación de energía y productividad a diferentes condiciones de pH después de 60 minutos de reacción. 101

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad grandes cantidades de residuos provenientes del sector pesquero no son aprovechados. Al mismo tiempo muchas plantas procesadoras de productos marinos no tienen permitido eliminar sus desechos directamente al océano sin un tratamiento previo, lo que puede resultar en elevados costos a la hora de tratarlos antes de poder ser desechados (Kristinsson & Rasco, 2000). Estos residuos provenientes de la industria pesquera se generan principalmente al utilizar los filetes del ejemplar, retirando la cola, el esquelón, espinas, cabeza, vísceras, etc. Cerca del 29,5% de la extracción mundial es transformada en un producto de poco aprovechamiento nutricional y bajo valor comercial como es la harina de pescado. De la producción restante, el 50% es considerado un desecho del proceso (Rebeca et al., 1991).

Cada año alrededor de 90 millones de toneladas de productos marinos son extraídos desde los océanos, sumado a la industria acuícola que produjo para el año 2012 casi 50 millones de toneladas y que va en constante crecimiento (Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, 2014). Por su parte Chile es uno de los mayores productores a nivel de pesca extractiva y acuícola con una producción total de 3,5 millones de toneladas de productos al 2012, de los cuales 3,2 millones de toneladas corresponden al desembarque de peces. Según datos de 2012, de la producción total de peces el 65% de la producción nacional se destina a producir harina de pescado, un 19% es destinado a congelados, conservas y otros; y finalmente solo el 16% se destina para venta como pescado fresco o enfriado (Cox & Bravo, 2014).

Debido al constante crecimiento de la población mundial, y a que la extracción de productos marinos se encuentra cerca de la máxima permitida (100 millones de toneladas/año) para mantener una producción sostenible. Existe una mayor necesidad de aprovechar los recursos marinos con inteligencia y previsión (Kristinsson & Rasco, 2000).

Una alternativa de tratamiento a estos recursos es la utilización de enzimas para hidrolizar enzimáticamente las proteínas presentes en la materia prima, la hidrólisis de proteína es un proceso en el cual se produce la ruptura de los enlaces que unen los amino ácidos que componen la proteína, formando péptidos de menor tamaño. La hidrólisis enzimática

produce una mejora de las propiedades físicas, químicas, funcionales y nutricionales de las proteínas originales (Qi & He, 2006). Dentro de estas mejoras en la materia prima original destacan un aumento en la solubilidad, retención de agua, capacidad emulsificante, espumante y capacidad de estabilización de alimentos (Kristinsson & Rasco, 2000). Asimismo, poseen propiedades bioactivas, que resultan beneficiosas para el organismo tales como antioxidantes, antihipertensivas, antimicrobianas, antitrombóticos, hipocolesterolémico, inmunomoduladores, actividad opoidea y antiproliferantes o anticancerígenas (Ashwell, 2002).

Mediante la utilización de enzimas es posible generar un amplio espectro de productos que pueden ser utilizados en la industria alimenticia como suplementos de leche, suplementos proteicos, estabilizadores en bebidas y potenciadores de sabor (Kristinsson & Rasco, 2000). Otra ventaja de la hidrólisis enzimática de proteínas es que se puede utilizar el ejemplar completo como también los subproductos generados en los diversos procesos de producción.

Las propiedades de los hidrolizados van a depender del grado de hidrólisis alcanzado, sin embargo, los distintos tipos de propiedades no varían de la misma manera, se utilizan grados de hidrólisis entre 1 y 10% para mejorar propiedades funcionales, hidrolizados con grados variables como saborizantes, y grados de hidrólisis mayor al 10% para usos en alimentación especializada. El grado de hidrólisis depende sin embargo de las condiciones de operación a las que se lleve a cabo la reacción, siendo estas condiciones la concentración de sustrato o proteína, la concentración de enzima utilizada o relación enzima/sustrato, el tiempo de reacción de la hidrólisis, además de las condiciones físico químicas como el pH y la temperatura (Benítez et al., 2008).

La producción comercial de hidrolizados enzimáticos de proteína de pescado es una industria relativamente nueva, sin embargo, ha alcanzado un nivel significativo en países como Francia, Japón y en el Sudeste Asiático. La producción de lotes de hidrolizados de proteína posee aun ciertas desventajas asociadas a: alto costo de enzimas utilizadas las cuales no pueden ser reutilizadas, dificultad para controlar la extensión de la reacción que puede generar productos no homogéneos, bajos rendimientos, y la necesidad de inactivar la enzima al final de la reacción mediante un cambio en el pH o por medio de tratamiento térmico, lo que añade costos al proceso.

La hidrólisis enzimática de proteína de pescado a nivel industrial y a pequeña escala consta de diversas etapas. (i) Homogenización: en primera instancia se tiene la materia prima molida la cual, con el objetivo de hacerlo económicamente viable, usualmente se añade agua en una razón de 1:1 y se agita hasta obtener una mezcla homogénea posteriormente se añade calor hasta alcanzar la temperatura deseada y se ajusta el pH al cual se hidrolizará. (ii) Reacción: Se añade la enzima en la concentración deseada y se da inicio a la reacción de hidrólisis enzimática. (iii) Inactivación: Para dar término a la reacción es necesario inactivar la enzima, esto se logra mediante el aumento de la temperatura o disminuyendo el pH. (iv) Centrifugación: en esta etapa se genera la separación por gravedad de los componentes del hidrolizado, se forman generalmente tres fases, fase superior de lípidos, fase intermedia denominada sobrenadante, y una tercera fase compuesta por el material insoluble que precipita. (v) Separación de Sobrenadante: en esta etapa se colecta el sobrenadante, el cual es la fase de interés de la que se formará el hidrolizado de proteína final. (vi) Secado: en esta fase se somete el sobrenadante a un proceso de secado donde finalmente se obtiene el hidrolizado (Kristinsson & Rasco, 2000).

Para que la hidrólisis sea un proceso aplicable a la industria debe ser económicamente viable en comparación con los costos de tratamiento actuales que existen, es por este motivo que, si se puede reducir costos en el proceso sin perder la eficiencia en el producto final obtenido, generará un mayor beneficio. Rebeca et al., (1991) realizó un estudio utilizando salmonete eviscerado donde sin la adición de agua, con el objetivo de disminuir los costos de secado del proceso, el experimento dio resultado un mayor contenido de materia seca, con una alta recuperación de proteína de la fracción soluble y una reducción del coste de secado. Considerando lo anterior es que en ésta investigación se propuso hidrolizar enzimáticamente los residuos de merluza, a altas concentraciones de sólido y sin control del pH, postulando que esto permite disminuir los costos totales asociados al proceso de hidrólisis sin perjudicar la calidad del producto final.

Dicho lo anterior, en este estudio se realizará un análisis de los efectos de las condiciones de operación, específicamente temperatura, concentración inicial de proteína y concentración inicial de enzima, todos estos experimentos serán llevados a cabo sin control de pH y a concentraciones de sólidos elevadas, éste estudio se realizará por medio del modelamiento de la reacción enzimática, lo cual permitirá a partir de la información obtenida predecir y

diseñar la característica del hidrolizado final, modificando las condiciones de operación. Finalmente se podrá comparar en términos de energía necesaria y de producto generado, las diferencias entre hidrolizar bajo las condiciones propuestas respecto a una hidrólisis típica con control de pH y baja concentración de sólidos.

Capítulo 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Caracterizar la hidrólisis enzimática de proteínas de residuos de merluza a altas concentraciones de sólidos y sin control de pH.

2.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos para esto son:

- Diseñar un reactor para operar a condiciones de alta concentración de sólidos.
- Determinar el efecto de la concentración inicial de enzima (E), temperatura (T) y concentración inicial de proteína (S), sobre la curva de hidrólisis.
- Modelar el efecto de E, T y S sobre la curva de hidrólisis.
- Determinar los parámetros a´ y b de la ecuación logarítmica con cada curva de conversión.
- Correlacionar los parámetros a’ y b’ con las variables de operación E, T y S.
- Correlacionar el porcentaje de extracción de nitrógeno con las variables de operación E, T y S.
- Comparar la producción de grupos α-amino ácidos en hidrólisis con y sin control de pH, bajo las mismas condiciones de operación E, T y S.

Capítulo 3

ANTECEDENTES

3. ANTECEDENTES

3.1 Industria pesquera y acuícola mundial.

La producción mundial de pescado ha crecido de manera constante en las últimas cinco décadas como se muestra en la Figura 3.1. A su vez el suministro de pescado para consumo ha aumentado a una tasa anual de 3,2%, superando el crecimiento de la población mundial en 1,6 %. El consumo mundial de pescado per cápita aumentó de un promedio de 9,9 kg en 1960 a 19,2 kg en 2012 según estimaciones como se muestra en la Tabla 3.1 y Figura 3.2. Este desarrollo ha sido impulsado por una combinación de crecimiento de la población, aumentos de los ingresos y la urbanización, y facilitado por la fuerte expansión de la producción de pescado y los canales de distribución más eficientes (Cox & Bravo, 2014).

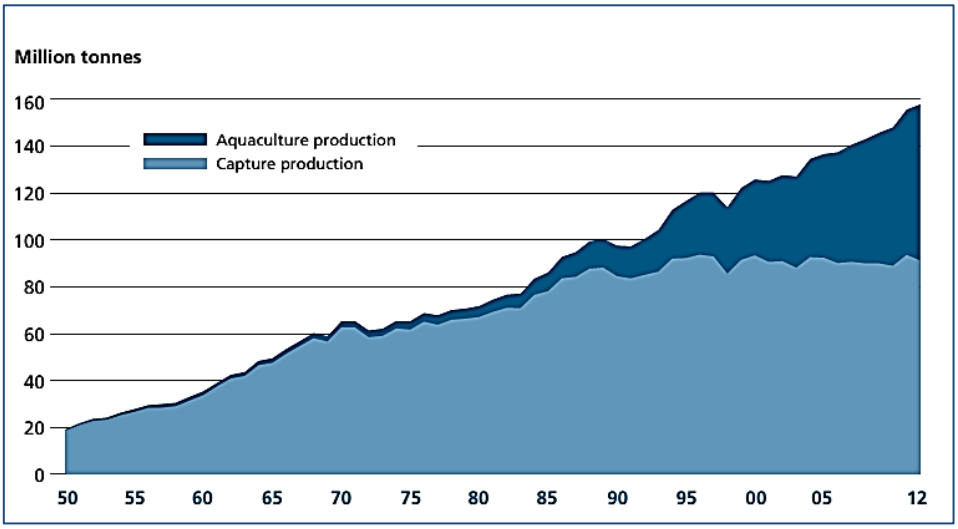

Figura 3.1. Producción mundial de pesqueras y acuicultura (millones de toneladas).
Fuente: (Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, 2014)

Muchos de los recursos pesqueros del mundo han sufrido sobreexplotación debido a la captura acumulada en los últimos sesenta años, lo que ha debido ser enfrentado por la mayoría de los países con cuotas de pesca y vedas, estas políticas más estrictas y vedas han permitido que la sobreexplotación disminuya y que su vez la pesca extractiva se mantenga en aproximadamente 90 millones de toneladas por año (Cox & Bravo, 2013).

Tabla 3.1. Producción mundial y utilización.

	2007	2008	2009	2010	2011	2012
	Millones de toneladas					
PRODUCCIÓN						
Captura						
Continente	10,1	10,3	10,5	11,3	11,1	11,6
Océanos	80,7	79,9	79,6	77,8	82,6	79,7
Total captura	90,8	90,2	90,1	89,1	93,7	91,3
Acuicultura						
Continente	29,9	32,4	34,3	36,8	38,7	41,9
Océanos	20	20,5	21,4	22,3	23,3	24,7
Total Acuicultura	49,9	52,9	55,7	59,1	62	66,6
Total producción mundial	**140,7**	**143,1**	**145,8**	**148,2**	**155,7**	**157,9**
UTILIZACIÓN						
Consumo Humano	117,3	120,9	123,7	128,2	131,2	136,2
Non-food	23,4	22,2	22,1	20	24,5	21,7
Población (billones)	6,7	6,8	6,8	6,9	7	7,1
Suministro per cápita (kg)	17,5	17,8	18,2	18,6	18,7	19,2

Fuente: (Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, 2014).

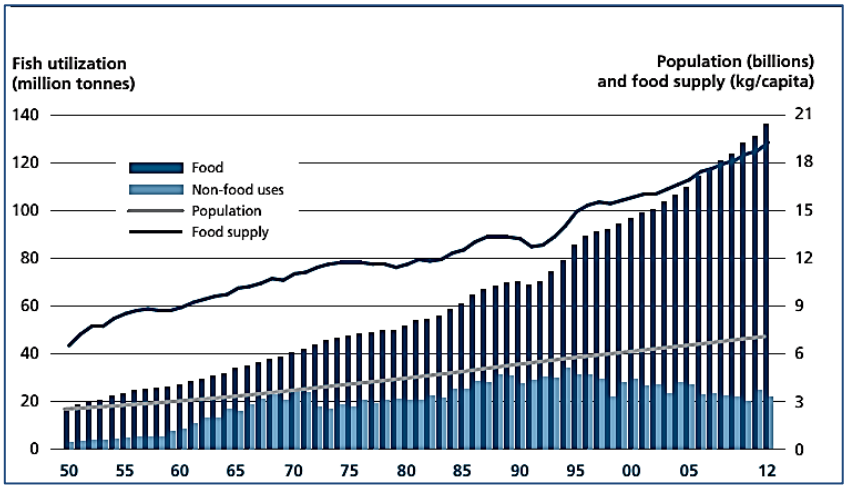

Figura 3.2. Utilización mundial de pesca y suministro.
Fuente: (Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, 2014)

Por su parte la acuicultura va en constante aumento desde los 50 millones de toneladas en 2007 a 66 millones de toneladas en 2012, lo que ha logrado mantener el constante crecimiento de la industria pesquera total, a pesar del estancamiento de la pesca extractiva.

3.1 Industria pesquera y acuícola nacional.

3.1.1 Desembarque nacional

Chile se encuentra dentro de los 10 mayores productores de pescado tanto a nivel de pesca extractiva en océanos, como en producción acuícola como se muestra en las Tabla 3.2 y Tabla 3.3.

Tabla 3.2. Mayores productores por pesca extractiva mundial.

			Toneladas			Variación	
Ranking 2012	**País**	**Continente**	**2003**	**2011**	**2012**	**2003-2012**	**2011-2012**
1	China	Asia	12.212.188	13.536.409	13.869.604	13,6	2,5
2	Indonesia	Asia	4.275.115	5.332.862	5.420.247	26,8	1,6
3	U.S.A	América	4.912.627	5.131.087	5.107.559	4,0	-0,5
4	Perú	América	6.053.120	8.211.716	4.807.923	-20,6	-41,5
5	Rusia	Asia/ Europa	3.090.798	4.005.737	4.068.850	31,6	1,6
6	Japón	Asia	4.626.904	3.741.222	3.611.384	-21,9	-3,5
7	India	Asia	2.954.796	3.250.099	3.402.405	15,1	4,7
8	Chile	América	3.612.048	3.063.567	2.572.881	-28,8	-16,0
9	Vietnam	Asia	1.647.133	2.308.200	2.418.700	46,8	4,8
10	Birmania	Asia	1.053.720	2.169.820	2.332.790	121,4	7,5
11	Noruega	Europa	2.548.353	2.281.856	2.149.802	-15,6	-5,8
12	Filipinas	Asia	2.033.325	2.171.327	2.127.046	4,6	-2,0
13	República Korea	Asia	1.649.061	1.737.870	1.660.165	0,7	-4,5
14	Tailandia	Asia	2.651.223	1.610.418	1.612.073	-39,2	0,1
15	Malasia	Asia	1.283.256	1.373.105	1.472.239	14,7	7,2
16	México	América	1.257.699	1.452.970	1.467.790	16,7	1,0
17	Islandia	Europa	1.986.314	1.138.274	1.449.452	-27,0	27,3
18	Marruecos	África	916.988	949.881	1.158.474	26,3	22,0
Total 18 mayores países			**58.764.668**	**63.466.420**	**60.709.384**	**3,3**	**-4,3**
Mundial total			**79.674.875**	**82.609.926**	**79.705.910**	**0,0**	**-3,5**
Participación 18 países			73,8	76,8	76,2		

Fuente: (Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, 2014)

Tabla 3.3. Mayores productores acuícolas mundial.

País	Peces		Crustáceos	Moluscos	Otras especies	Total Nacional	Participación mundial
	Acuicultura continental	Acuicultura en océano					
	Toneladas						%
China	23.341.134	1.028.399	3.592.588	12.343.169	803.016	41.108.306	61,9
India	3.812.420	84.164	299.926	12.905		4.209.415	6,3
Vietnam	2.091.200	51.000	513.100	400.000	30.200	3.085.500	4,6
Indonesia	2.097.407	582.077	387.698		477	3.067.659	4,6
Bangladés	1.525.672	63.220	137.174			1.726.066	2,6
Noruega	85	1.319.033		2.001		1.321.119	2,0
Tailandia	380.986	19.994	623.660	205.192	4.045	1.233.877	1,9
Chile	59.527	758.587		253.307		1.071.421	1,6
Egipto	1.016.629		1.109			1.017.738	1,5
Birmania	822.589	1.868	58.981		1.731	885.169	1,3
Filipinas	310.042	161.722	72.822	46.308		590.894	0,9
Brasil	611.343		74.415	20.699	1.005	707.462	1,1
Japón	33.957	250.472	1.596	345.914	1.108	633.047	1,0
República de Korea	14.099	76.307	2.838	373.488	17.672	484.404	0,7
U.S.A	185.598	21.169	44.928	168.329		420.024	0,6
Top 15 total	36.302.688	4.418.012	5.810.835	14.171.312	859.254	61.562.101	92,7
Resto del mundo	2.296.562	933.893	635.983	999.426	5.288	4.871.152	7,3
Mundial	38.599.250	5.351.905	6.446.818	15.170.738	864.542	66.433.253	100,0

Fuente: (Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO, 2014)

El desembarque total del sector pesquero en Chile involucra puertos, caletas o barcos transportadores de los sectores de pesca artesanal e industrial, captura de barcos factoría, cosecha de centros de cultivo y recolección de algas.

En los últimos sesenta años se han llevado registros del desembarque total de peces, moluscos, crustáceos, algas y otros, que comenzó desde un volumen cercano a las 90 mil

toneladas en 1951 a más de 8 millones de toneladas en su máximo en 1994, la Figura 3.1 muestra el desembarque a lo largo de los años (Cox & Bravo, 2014).

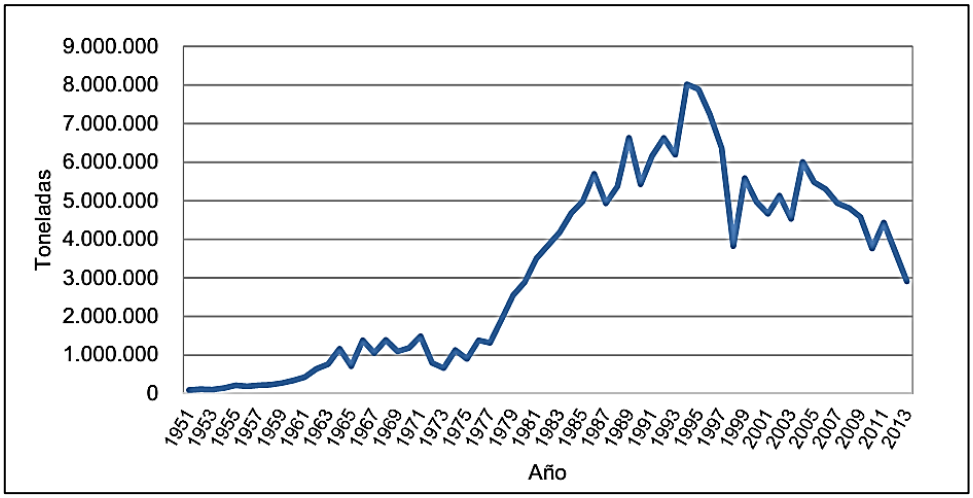

Figura 3.1. Desembarque total del sector pesquero (ton).

Fuente: ODEPA, 2014.

3.1.2 Distribución del desembarque nacional

La Figura 3.1 muestra el desembarque de peces por año por subsector considerando pesca industrial, artesanal y sector acuícola, en donde se aprecia que la forma de la gráfica se ve influenciada casi en su totalidad por el desembarque industrial.

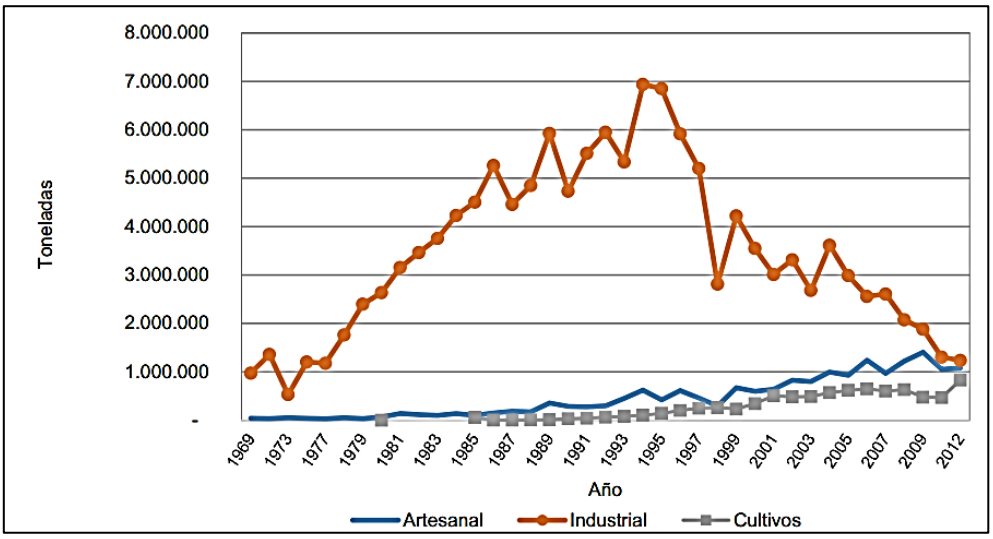

Figura 3.2. Desembarque total de peces por subsector (ton).

Fuente: ODEPA, 2014.

Para entender mejor la situación en Chile a lo largo las últimas décadas, la Figura 3.3, Figura 3.4 y Figura 3.5 muestran la escasa participación en los años 90 tanto del sector acuícola como artesanal con un 0,57% y 5,64% respectivamente, donde casi la totalidad del desembarque era generado por el sector industrial con 4 millones de toneladas abarcando el 94% del desembarque nacional. Ya en el año 2000 la pesca extractiva industrial comienza un fuerte descenso mientras que la industria acuícola y pesca artesanal aumentan paulatinamente. Actualmente basado en el desembarque del año 2012, se puede apreciar una distribución más equiparada del desembarque donde la industria acuícola alcanza el 26,36% del total nacional, el sector artesanal 34,30% dejando al sector industrial con un 39,34% del total nacional. La baja del desembarque total industrial, se debe entre otros factores a la disminución de pesquerías, especialmente de Jurel y Anchoveta, provocada por una sobreexplotación del recurso, sumado a efectos provocados por la corriente del niño la cual altera la temperatura de los mares, generando una disminución de las especies los que genera un aumento en los costos de operación, todo esto sumado a las cuotas de extracción que por normativa han sido reguladas en los últimos años (Cox & Bravo, 2014).

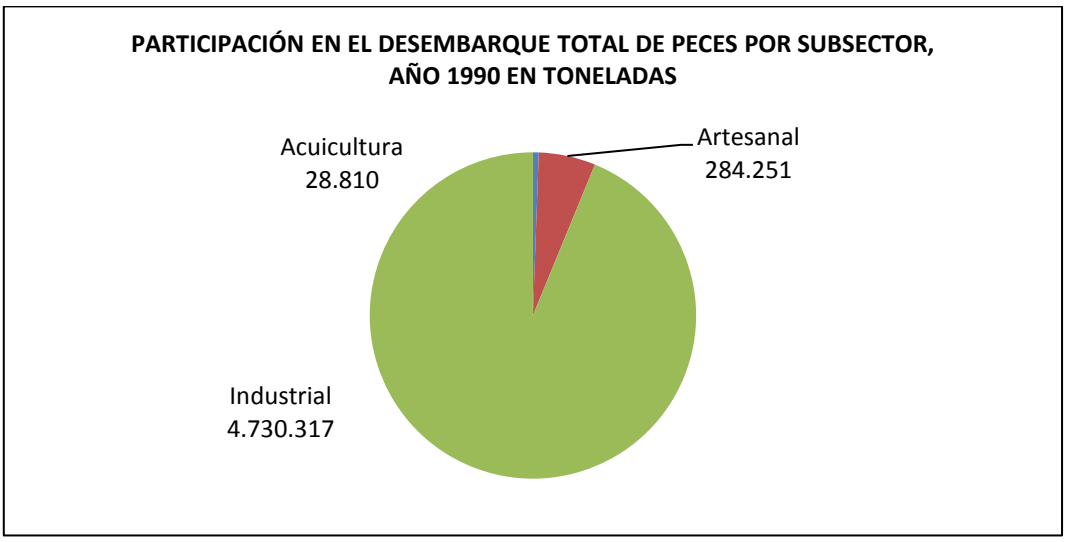

Figura 3.3. Participación del desembarque nacional en 1990.
Fuente: (Cox & Bravo, 2014)

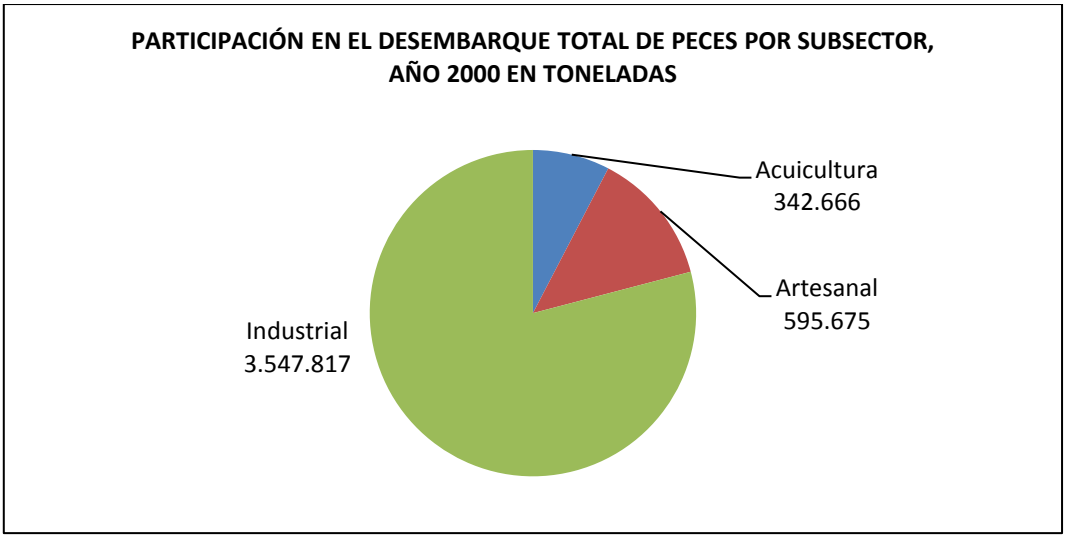

Figura 3.4. Participación del desembarque nacional en 2000.
Fuente: (Cox & Bravo, 2014)

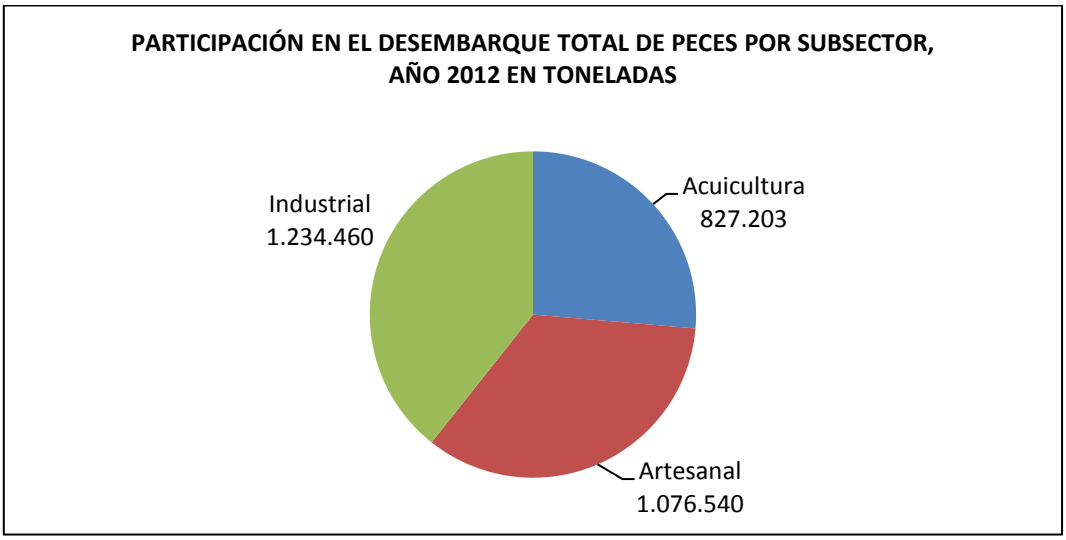

Figura 3.5. Participación del desembarque nacional en 2012.
Fuente: (Cox & Bravo, 2014)

3.1.3 Destino del desembarque

La utilización nacional del desembarque generado en Chile es destinada para distintos usos, para el caso de los peces la mayoría de la extracción es enviada hasta hoy en día para la producción de Harina y aceite de pescado, en un porcentaje menor para conservas y congelados siendo la producción en fresco el menor de los tres usos como muestra la Tabla 3.4 y Tabla 3.5.

Tabla 3.4. Utilización del desembarque total nacional de peces**.**

PRODUCTO	1970	1990	200	2011	2012
Peces					
Fresco y enfriado	6%	3%	1%	11%	16%
Congelado, conserva y otros	3%	9%	19%	15%	19%
Harina	91%	88%	80%	74%	65%

Fuente: (Cox & Bravo, 2014)

Tabla 3.5. Utilización del desembarque total nacional en toneladas.

PRODUCTO	1970	2012
Fresco y enfriado	78.813	504.874
congelado, conserva y otros	45.552	582.551
Harina	1.263.657	2.050.778
Total peces	1.342.516	3.138.203

Fuente: (Cox & Bravo, 2014)

A principio de la década de los 70, cerca del 91% de los peces se destinaba a la industria de la harina, actualmente ese valor ha disminuido hasta un 65%. Existe un aumento en la utilización de frescos y congelados durante los últimos años, explicado principalmente por el aumento de la industria acuícola en la que se trabaja con truchas y salmones, que precisamente van a líneas de proceso de frescos y congelados. Actualmente la producción de harina proviene en 90% de la captura de anchoveta, sardina y bacaladillo. El 10% restante lo aportan el jurel, la merluza de cola y la caballa. Una parte importante de la captura del sector artesanal es entregada al sector industrial, lo que genera una complementación entre ambos sectores (Cox & Bravo, 2014).

3.1.4 Generación de residuos de la industria

Cerca del 50% del peso del pescado completo se convierte en residuo, posteriormente a que los filetes se hayan extraído. Parte de la carne que queda en los residuos de pescado puede ser extraída con máquinas de extracción de carne, pero aun así se estima que alrededor del 40% de la captura total que contiene un 10% de peso en proteínas no es utilizado en las actividades del proceso (Mackie, 1982).

La Tabla 3.6 muestra la composición en peso de un ejemplar de Bacalao.

Tabla 3.6. Composición promedio de un ejemplar de bacalao

Componente	% Entero		% Eviscerado
	Peso	Promedio	Promedio
Cabeza		21	25
Tripas*	5-8	7	
Hígado*	2-7	5	
Huevas*	1-7	4	
Espinazo		14	16
Aletas y orejetas		10	12
Piel		3	4
Filete sin Piel		36	43
Total		100	100

Fuente: (Mackie, 1982). * Se retiran al eviscerar.

Este porcentaje de residuo se puede extrapolar a casi toda la producción nacional, en la que se tiene que sea cual sea el ejemplar a producir los residuos asociados siempre estarán en un rango del 40-50% del ejemplar total. Sólo en Caleta Portales, ubicada en la Comuna de Valparaíso se generan por día 1,5 toneladas al día de residuos en las que principalmente se encuentran 690 kg de residuos de reineta y 216 kg de merluza.

Por otra parte, se debe considerar que la industria acuícola posee una tasa de mortandad de sus salmónidos que se convierten en residuos y que son generalmente enviados a plantas reductoras convirtiéndolos principalmente en harina y aceite de pescado.

La Tabla 3.7 muestra la mortandad de la industria acuícola en Chile.

Tabla 3.7. Mortalidad de salmónidos destinados a plantas reductoras en 2015.

Especie	Región	Total general [ton]
SALMON DEL ATLANTICO	7	94,90
	8	8720,98
	9	575,24
	10	2610,56
	11	1482,98
	14	150,64
SALMON PLATEADO O COHO	8	3,55
	9	24,50
	10	461,20
	11	140,58
	14	237,07
TRUCHA ARCOIRIS	8	96,82
	9	28,93
	10	1634,21
	11	1863,78
	14	13,55
Total general		**18139,50**

Fuente: Consulta SERNAPESCA n°460038816.

Como se puede apreciar, más de 18 toneladas de ejemplares que murieron en el proceso de producción fueron enviados el año 2015 desde los criaderos de salmón a las plantas reductoras.

3.2 Propiedades funcionales de los alimentos

El concepto de alimento funcional aparece por primera vez en Japón, después de una serie de programas fundados por el gobierno japonés para el estudio de alimentos que pudieran tener potenciales beneficios a la salud, finalmente se define en 1991 la sigla FOSHU, “Alimentos para usos específicos en salud” (Foods for Specific Health Use) cuyo significado alude a “Aquellos alimentos que se espera que tengan un efecto específico en la salud como

resultado de sus constituyentes relevantes, o aquellos alimentos a los cuales sus agentes alergénicos han sido removidos" (Ashwell, 2002).

Kristinsson & Rasco definieron las propiedades funcionales de las proteínas como "aquellas propiedades funcionales y químicas que afectan el comportamiento de los alimentos durante su procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo" (Kristinsson & Rasco, 2000). Además, sugirieron que los hidrolizados de proteínas de pescado poseían excelentes propiedades funcionales como una alta solubilidad, buenas propiedades emulsionantes, buenas capacidad espumante y capacidad de retención de agua.

Por otra parte, FUFOSE (Functional Food Science in Europe) propuso en 2002 que un alimento puede ser llamado funcional si "Está satisfactoriamente demostrado que afecta beneficiosamente una o más funciones objetivo en el cuerpo, más allá de su valor nutricional adecuado, ya sea si es relevante para una mejora en el estado de salud, bienestar o reducción de los riesgos de enfermedad" (Ashwell, 2002).

Además de esta definición la FUFOSE también propone diversos aspectos que deben tener los alimentos funcionales:

- La naturaleza alimentaria de los alimentos funcionales: no es una píldora, una cápsula o ningún otro suplemento dietético.
- Demostración de los efectos de satisfacción por la comunidad científica.
- Los efectos benéficos sobre las funciones corporales, más allá de los efectos nutricionales, deben ser relevantes para mejorar el estado de salud y bienestar y/o reducción del riesgo (no prevención) de enfermedades.
- El consumo debe ser parte de un patrón de alimentación normal.

Las propiedades funcionales además pueden ser clasificadas en tres categorías diferentes dependiendo del beneficio que otorgan:

Propiedades tecnológicas: Son aquellas propiedades funcionales definidas por Kristinsson & Rasco, (2000), las cuales dependen de las propiedades físico químicas de los péptidos hidrolizados como el peso molecular, carga, hidrofobicidad e hidrofilicidad. Estas propiedades incluyen la solubilidad, capacidad emulsionante, capacidad espumante, capacidad de absorción de grasas, capacidad de retención de agua y el tamaño molecular promedio.

Propiedades Bioactivas: Son aquellas definidas por el ILSI (Ashwell, 2002) como aquellas propiedades biológicas útiles en el mejoramiento de la salud humana. Entre estas propiedades se encuentran: antioxidantes, antihipertensivas, antimicrobiana, antitrombóticos, hipocolesterolémico, inmunomoduladores, actividad opioidea y antiproliferantes (con respecto a las células cancerígenas).

Propiedades Sensoriales: Se refiere a las propiedades organolépticas de los hidrolizados tales como sabor, olor, textura. Para los hidrolizados de proteína de pescado el más importante es sabor.

3.3 Hidrolisis de proteínas

El término hidrólisis hace referencia a la ruptura de alguna molécula por acción del agua. En el caso de las proteínas el enlace que se rompe es el peptídico, el cual une los aminoácidos que componen una proteína. La hidrólisis es la ruptura de la estructura primaria de la proteína, generando así péptidos de diferentes tamaños y amino ácidos libres dependiendo del avance de la reacción. Si el avance de la reacción es completo hasta la obtención de amino ácidos libres se denomina hidrolisis total de proteína.

3.3.1 Hidrolisis química

La hidrólisis química se refiere al corte de los enlaces peptídicos de la proteína por la adición de un ácido o una base. Este método de hidrólisis fue utilizado en el pasado por ser un método relativamente económico y simple de realizar, sin embargo, existen muchas limitaciones para utilizar estos productos como ingredientes para alimentos. La hidrólisis química tiende a ser un proceso difícil de controlar y genera productos con propiedades funcionales y composición variables. La hidrólisis de proteína con agentes químicos fuertes y solventes son llevadas a cabo generalmente a temperaturas y pH extremos lo que se traduce en un producto con una calidad nutricional reducida, propiedades funcionales muy bajas y además no es posible utilizarlos como potenciadores de sabor (Kristinsson & Rasco, 2000).

Hidrólisis ácida

La mayoría de los hidrolizados proteicos consumidos en los Estados Unidos son preparados mediante hidrólisis ácida principalmente de fuentes vegetales utilizadas como saborizantes para carne procesada y sopas. Es un proceso difícil de controlar que genera un producto pobre nutritivamente y de baja funcionalidad, aun así, sigue siendo el método preferido para hidrolizar proteína proveniente de fuente vegetal debido al alto grado de hidrolisis final alcanzado. La hidrólisis ácida de proteína de pescado implica generalmente la reacción de proteínas de pescado con ácido clorhídrico y en algunos casos con ácido sulfúrico, para estos casos las proteínas son completamente hidrolizadas a altas temperaturas y a menudo a altas presiones. El hidrolizado es posteriormente neutralizado a pH 6.0 o 7.0, para luego ser secado o concentrado. Esto genera un producto de un alto grado de hidrolisis, con una elevada solubilidad, sin embargo, durante el proceso de neutralización se generan grandes cantidades de sal (NaCl) lo que genera un producto de sabor desagradable. Otro factor importante a considerar en la hidrólisis ácida es la desnaturalización y destrucción del triptófano, el cual es un amino ácido esencial (Kristinsson & Rasco, 2000).

Hidrólisis alcalina

Utilizar reactivos químicos alcalinos o básicos, produce hidrolizados de baja funcionalidad y afecta su valor nutritivo, principalmente se utiliza Hidróxido de Sodio (NaOH). A pesar de esto la hidrólisis alcalina es utilizada en la industria para recuperar y solubilizar un amplio rango de proteínas. Sin embargo diversas reacciones perjudiciales ocurren en la hidrólisis alcalina como la formación de D-amino ácidos los cuáles no pueden ser absorbidos por humanos, y la formación de compuestos tóxicos indeseables en los alimentos como Lysinoalanina (LAL), Lantionina y Ornitoalanina (Kristinsson & Rasco, 2000).

3.3.2 Hidrólisis Bioquímica

La hidrólisis bioquímica para producir hidrolizados de pescado u otros hidrolizados, es llevada a cabo utilizando enzimas las cuales catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas. Este proceso puede realizarse utilizando enzimas proteolíticas que se encuentran en las vísceras de los peces (proteasas endógenas) o mediante la adición de enzimas provenientes de otras fuentes (proteasas exógenas).

En la industria alimenticia y en investigaciones las enzimas utilizadas son generalmente hidrolasas, en su mayoría carbohidrasas, seguidas de proteasas y lipasas. Las proteasas son sin embargo las enzimas mejor caracterizadas, y son económicamente el grupo más importante de enzimas.

Las proteasas comerciales disponibles pueden ser clasificadas, por su origen (animal, vegetal, bacteriano o Fúngico), por su modo de acción catalítica (endo- o exo-actividad) o con base en su sitio catalítico. Las endoproteasas hidrolizan enlaces amídicos dentro de la cadena de la proteína. Las exoproteasas, por el contrario, eliminan aminoácidos terminales de las proteínas o péptidos. El centro activo de las proteasas contiene aminoácidos o bien cationes metálicos que promueven la catálisis, denominándose serinproteasas, cisteinproteasas (o proteasas tiol), aspartato proteasas, según intervengan los aminoácidos serina, cisteína o ácido aspártico. En las metalo-proteasas la actividad está promovida por un catión metálico, siendo el más frecuente el zinc. Todas las serinproteasas tienen actividad endo. Contrariamente las metalo-proteasas son sobre todo exo-proteasas (Benítez et al., 2008).

Hidrólisis auto lítica o autolisis de pescado

La hidrólisis enzimática de proteína de pescado puede ser llevada a cabo utilizando las enzimas digestivas que se encuentran en las vísceras de los peces. Mediante este método no existe un costo asociado a las enzimas y resulta una operación simple de realizar, lo que genera un producto viscoso rico en grupos alfa amino ácidos libres y péptidos pequeños, pero con procesos que pueden tardar semanas hasta obtener el producto deseado.

La hidrólisis autolítica sin embargo depende mucho de las condiciones iniciales de operación ya que las enzimas presentes en cada pez varían de acuerdo a la especie, edad y sexo del ejemplar, lo que genera un proceso difícil de controlar en términos de la composición del

producto final si se desea que éste tenga propiedades específicas. Su valor nutricional sin embargo se mantiene a diferencia de la hidrólisis química (Kristinsson & Rasco, 2000).

Hidrólisis de pescado por adición de enzimas

La hidrólisis mediante la adición de enzimas es un proceso que tiene la virtud de no sólo mantener el valor nutritivo del hidrolizado, sino que además puede resultar en una mejora de las propiedades físico-químicas, funcionales y sensoriales con respecto a la materia prima inicial. Otra ventaja que posee la hidrólisis enzimática es que no produce productos tóxicos como los que se observan en la hidrólisis química.

La principal diferencia entre utilizar enzimas añadidas y endógenas, es que el proceso puede ser controlado y diseñado fácilmente debido a la especificidad que posee cada enzima de acuerdo al sustrato y la consecuente reacción que este produce.

Generalmente la hidrólisis mediante enzimas añadidas se lleva a cabo en especies de peces que no son ampliamente utilizadas y para los residuos que se generan en la industria pesquera o acuícola, los cuales buscan revalorizar esa biomasa no utilizada. Los residuos provenientes de la industria no pueden ser desechados si no son previamente tratados consecuentemente con un alto costo de tratamiento. Esta biomasa desechada puede llegar a significar hasta el 64% del peso del pez total, por lo que revalorizar esta materia prima es una alternativa para la industria.

A pesar de que es un proceso de fácil control de en el cual se generan productos más homogéneos que en la autolisis, la hidrólisis mediante enzimas añadidas posee algunas desventajas como: alto costo de la adquisición de las enzimas, necesidad de inactivación mediante calentamiento o cambio de pH al final de la reacción lo que añade costos al proceso y las enzimas no pueden ser reutilizadas (Kristinsson & Rasco, 2000).

3.3.3 Hidrolizados proteicos

Los hidrolizados proteicos pueden definirse como proteínas que son químicamente o enzimáticamente cortadas en péptidos de diferentes tamaños producto de la reacción de hidrólisis.

Los hidrolizados son producidos para una amplia variedad de usos en la industria alimenticia, como sustitutos de leche, suplementos proteicos estabilizadores en las bebidas y saborizantes para productos de confitería (Kristinsson & Rasco, 2000).

Una de las aplicaciones más importantes de los hidrolizados de proteína es su utilización como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas enterales con destino a la alimentación infantil y/o de adultos enfermos. Estas dietas se diseñan para ser absorbidas en el intestino sin una digestión previa en el estómago y son esenciales en el tratamiento de pacientes con desórdenes estomacales o problemas de mucosa intestinal, así como lactantes con síndrome de malabsorción-malnutrición, o con cuadros alergénicos en la mayoría de los casos. Estos hidrolizados deben cumplir ciertos requisitos como no producir desequilibrios osmóticos ni alergias, presentar un alto valor nutritivo, no muy inferior al de la proteína de partida y tener un sabor aceptable (Benítez et al., 2008).

Los distintos hidrolizados que se producen comercialmente para uso en la alimentación se pueden agrupar en: hidrolizados con bajo grado de hidrólisis entre (1% y 10%) para mejora de propiedades funcionales; hidrolizados con grados de hidrolisis variables para uso como saborizantes, y por ultimo hidrolizados con un grado de hidrólisis superior al 10%, para su uso en alimentación especializada (Benítez et al., 2008).

3.4 Grado de hidrólisis

Para realizar un seguimiento de la reacción y avance de la hidrólisis, se utiliza un parámetro denominado Grado de Hidrólisis (%DH) y se define como la razón entre los enlaces peptídicos rotos (h) respecto al número total de enlaces peptídicos (h_{Tot}), la cual se expresa en un porcentaje como muestra la siguiente ecuación:

$$\% \, DH = \frac{h}{h_{Tot}} \cdot 100 \tag{3.1}$$

Existen numerosos métodos para la determinación del grado de hidrólisis. Uno de los métodos utilizados es la determinación de la cantidad de nitrógeno liberado durante la hidrólisis, mediante la adición de un agente precipitante. Los métodos utilizados incluyen el uso del método de Kjeldahl o determinación por espectrofotometría en la región visible después de una reacción colorimétrica (Spellman et al., 2003)

El grado de hidrólisis puede ser cuantificado además por la determinación de los grupos alfa-aminos liberados durante la hidrólisis mediante valoración con formol, o utilizando compuestos que reaccionan específicamente con los grupos aminos como el ácido trinitrobenceno sulfúrico (TNBS), o-ftaldialdehído (OPA), ninhidrina, o fluoresceína. El DH también puede ser cuantificado utilizando osmometría donde la disminución en el punto de congelación puede ser usada para calcular cambios en la osmolalidad durante la hidrólisis, lo que es utilizado para calcular el grado de hidrólisis. En el método del pH-stat los protones liberados durante la hidrólisis son valorados y luego relacionados con el grado de hidrólisis (Spellman et al., 2003). Sin embargo, los métodos comúnmente utilizados para la cuantificación del grado de hidrólisis durante las hidrólisis de proteínas son el pH-stat, OPA y TNBS.

3.4.1 Método basado en la valoración del protón: pH-stat

El mecanismo de hidrólisis y de valoración de los grupos alfa amino liberados se puede describir mediante las siguientes reacciones (Qi & He, 2006).

Ruptura del enlace peptídico:

$$R_1CONHR_2 + H_2O \xrightarrow{Enzima} R_1COOH + R_2NH_2 \tag{3.2}$$

Intercambio de protones:

$$R_1COOH + R_2NH_2 \rightarrow RCOO^- + R_2NH_3^+ \tag{3.3}$$

Valoración del grupo alfa amino:

$$R_2NH_3^+ + OH^- \rightarrow R_2NH_2 + H_2O \tag{3.4}$$

La técnica del pH es la más comúnmente utilizada y práctica para aplicaciones industriales. El principio por el cual funciona este método es bastante simple y se basa principalmente en mantener el pH constante durante la hidrólisis, mediante la adición de una base. Luego el grado de hidrólisis es calculado por el volumen y la normalidad de la base añadida para mantener ese pH constante (Kristinsson & Rasco, 2000).

3.4.2 Método de cuantificación de DH mediante TNBS

El método TNBS se basa en la concentración de grupos alfa aminos primarios en el hidrolizado. Es un ensayo espectrofotométrico donde el cromóforo (responsable del color de la molécula) formado por la reacción del TNBS con los grupos α-amino liberados que son detectables a 420 nm, a condiciones ligeramente alcalinas (Adler-Nissen, 1979) como muestra la Figura 3.6.

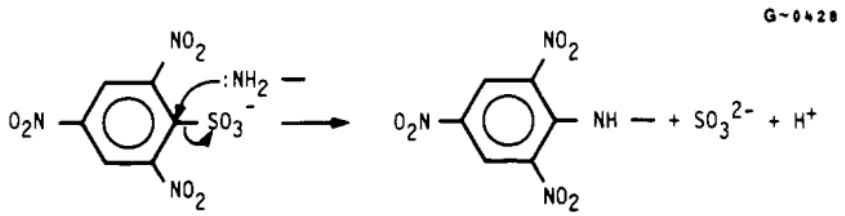

Figura 3.6. Reacción de TNBS con los grupos amino

3.4.3 Método de cuantificación de DH mediante OPA

El método OPA para medir grado de hidrólisis por determinación de grupos α-aminos libres es el propuesto por Church et al., (1983). Donde la reacción entre los grupos α-amino y el o-ftaldialdehído (OPA) en la presencia de mercaptoetanol forma un compuesto colorido el cual es detectable a 340nm mediante espectrofotometría, como muestra la Figura 3.7.

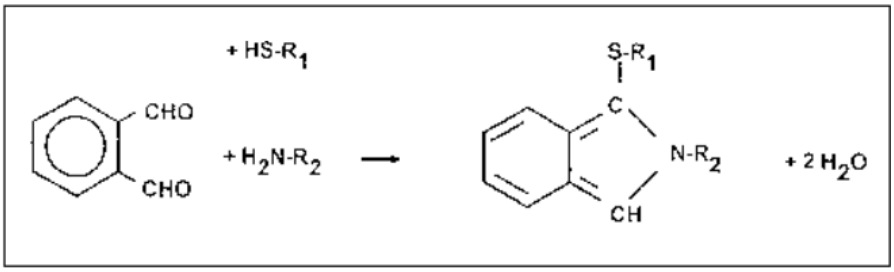

Figura 3.7. Reacción del OPA con los grupos alfa amino y DDT o mercaptoetanol.
Fuente: (Nielsen, 2001).

Nielsen, (2001) modificó el método utilizando Ditiotreitol (DTT) en vez de mercaptoetanol por ser ambientalmente más aceptable que el mercaptoetanol. Otra modificación al método es la selección de serina como estándar, dado que las reacciones con serina mostraban una respuesta muy cercana a la respuesta de los aminoácidos.

Para este método existe una subestimación de la cantidad de enlaces peptídicos rotos (h) en los primeros instantes de la reacción debido a que no necesariamente un enlace peptídico roto implica la formación de un péptido soluble, el cual puede ser detectado por el reactivo OPA.

3.5 Modelamiento matemático de la reacción de hidrólisis

La hidrólisis enzimática es un proceso difícil de modelar matemáticamente debido a que es una reacción compleja debido a varios factores: (i) la diversidad de los componentes de la reacción, es decir, los péptidos producidos durante la reacción son productos como también reactantes de la siguiente reacción; (ii) multiplicidad de los tipos de reacción: un gran número de enlaces peptídicos son cortados de manera simultánea en paralelo y secuencialmente; (iii) Complejidad de las redes de reacción, como la existencia de inhibición por sustrato, diversidad de productos e inactivación de enzima durante la hidrolisis; (iv) múltiples influencias exógenas como el pH, temperatura, fuerza iónica y la presión sobre la velocidad de reacción. Por estas razones es complejo predecir los resultados experimentales mediante la utilización de la ecuación de Michaelis-Menten (Qi & He, 2006).

Sin embargo, la ecuación de Michaelis-Menten ha sido utilizada para el modelamiento de hidrólisis enzimática de proteínas para diferentes fuentes de sustrato y de enzima. Algunos estudios han considerado sólo la ecuación simple de Michaelis-Menten, donde la reacción depende sólo de la concentración de sustrato [S] [(O'Meara & Munro, 1985); (Barros & Xavier Malcata, 2004); (Trusek-Holownia, 2008); (Apar & Özbek, 2009)]. Otros han considerado inhibición por producto [(Sousa et al., 2004); (Tardioli et al., 2005); (Demirhan et al., 2011); (Valencia et al., 2013)], inhibición por sustrato (Valencia et al., 2013), inactivación térmica de la enzima (Valencia et al., 2013) y la absorción de la enzima sobre la superficie de la proteína (O'Meara & Munro, 1985).

Por otra parte, un modelo basado en mecanismos cinéticos, pero utilizando una deducción matemática diferente a la de Michalis-Menten en base a sus resultados, fue obtenido por Marquez Moreno & Fernandez Cuadrado, (1992), ésta es la evidencia más antigua que se encontró en la que se utiliza este tipo de modelo para caracterizar hidrólisis enzimática de proteínas. Se trata de un modelo logarítmico simple con dos parámetros, cuya principal característica es que modela el grado de hidrolisis como función del tiempo de reacción (t) el cual es la única variable independiente junto con dos constantes cinéticas (a, b). El modelo describe la típica forma de la curva de hidrólisis de proteína frente a los datos experimentales con gran precisión. Este modelo fue posteriormente analizado por Qi & He, (2006) donde deducen una serie de expresiones para los parámetros a y b para diferentes tipos de

mecanismos (inhibición por sustrato, producto, no inhibición). Independiente del mecanismo la constante a siempre depende de la concentración inicial de enzima (E_0), y b depende del K_m. En base a este modelo los parámetros a y b pueden ser calculados desde una típica curva obtenida experimentalmente en el cual el grado de hidrólisis depende del tiempo. Sin embargo, el efecto combinado de las condiciones de operación, como la temperatura y pH, no está incluido en este modelo, y resulta complejo desarrollar un modelo teórico considerando todas las condiciones de operación como variables (Valencia et al., 2015).

Modelos empíricos también se han utilizado para modelar la hidrólisis de proteína de pescado como la metodología de superficie de respuesta (MSR) y redes neuronales artificiales (Artificial neural Networks, ANN). Las ecuaciones multivariables polinómicas ofrecen la posibilidad de estudiar los múltiples factores que afectan el proceso de hidrólisis, y además estos modelos pueden ser usados para optimización de las condiciones de operación del proceso con respecto a las variables dependientes. Para la hidrólisis de proteína de pescado las principales variables independientes o factores a considerar son: temperatura, pH, concentración de enzima, concentración de sustrato y tiempo de reacción. (Valencia et al., 2015).

Los modelos teóricos y empíricos poseen ciertas ventajas y desventajas. Por una parte, los modelos teóricos ofrecen una deducción conceptual y un significado físico de las constantes cinéticas, sin embargo, estas constantes no están necesariamente expresadas como función de las variables de operación. Por otra parte, los modelos empíricos como la metodología de superficie de respuesta (MSR) no son matemáticamente deducidos de ningún mecanismo y sus constantes carecen de un significado físico, sin embargo, ofrecen una caracterización y descripción simple y eficiente de los procesos tecnológicos (Valencia et al., 2015).

En el trabajo realizado por Valencia et al., (2015) planteó y probo una nueva metodología de modelamiento donde combinó la modelación teorética y empírica. Por una parte, la modelación conceptual contiene el componente teórico que le adiciona representación física al modelo, sumado a la componente empírica del MSR que le otorga simpleza y eficiencia. Esto se traduce en dos niveles de modelamiento en donde el primer nivel consiste básicamente en obtener los parámetros a y b a partir de la ecuación obtenida por Marquez Moreno & Fernandez Cuadrado, (1992) integrada, por medio de regresión no lineal. Y en un segundo nivel de modelamiento, la utilización de una ecuación polinomial para modelar las

constantes cinéticas a y b del modelo con respecto a las condiciones de operación, mediante la técnica MSR.

3.5.1 Mecanismo de reacción y modelo cinético

La reacción de hidrólisis es posible modelarla mediante un modelo semiempírico, Qi & He, (2006) plantearon una ecuación para la modelación de la hidrólisis enzimática, esta se basa en el mecanismo de la reacción de hidrólisis enzimática, el cual puede ser simplificado como $E + S \leftrightarrow ES \xrightarrow{k_2} E + P$ donde la reacción depende de la etapa irreversible, es decir:

$$r = s_0 \frac{(dDH)}{dt} = k_2[ES] \tag{3.5}$$

El mecanismo de inactivación de la proteasa durante la reacción puede ser simplificada como $E + ES \xrightarrow{k_3} E_A + E_I + P$, la velocidad de inactivación se muestra a continuación:

$$-\frac{de}{dt} = k_3[E][ES] \tag{3.6}$$

Si la ecuación (3.5) se divide por (3.6) se obtiene:

$$-s_0 \frac{dDH}{de} = \frac{k_2}{k_3[E]} \tag{3.7}$$

Tomando en cuenta las inhibiciones por sustrato y por producto:

$$S + ES \overleftrightarrow{K_S} SES \tag{3.8}$$

$$E + P \overleftrightarrow{K_P} EP \tag{3.9}$$

En donde:

$$K_S = \frac{k_{-4}}{k_{+4}} \tag{3.10}$$

$$K_P = \frac{k_{-5}}{k_{+5}} \tag{3.11}$$

Las siguientes ecuaciones pueden ser deducidas bajo la hipótesis de pseudo-equilibrio:

$$[SES] = \frac{[S][ES]}{K_S} = \frac{[S]^2[E]}{K_m K_S} \tag{3.12}$$

$$[EP] = \frac{[E][P]}{K_P} = \frac{K_m[ES][P]}{K_P[S]} \tag{3.13}$$

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_m} \tag{3.14}$$

$$[E] = \frac{K_m[ES]}{[S]} \tag{3.15}$$

Y el balance de masa de la enzima puede ser expresada como:

$$e = [E] + [ES] + [SES] + [EP] \tag{3.16}$$

Sustituyendo la ecuación (3.12) -(3.15) en la ecuación (3.16) resultan las siguientes expresiones:

$$[E] = \frac{e}{1 + \frac{[S]}{K_m} + \frac{[S]^2}{K_s K_m} + \frac{[P]}{K_P}} \tag{3.17}$$

$$[ES] = \frac{e}{\frac{K_m}{[S]} + 1 + \frac{[S]}{K_S} + \frac{K_m[P]}{K_P[S]}} \tag{3.18}$$

Si $[S] \approx s_0$, $[P] \approx p$, las ecuaciones (3.17) y (3.18) pueden ser simplificadas como:

$$[E] = \frac{eK_mK_SK_P}{K_SK_Ps_0 + K_ps_0^2 + K_mK_Sp} \tag{3.19}$$

$$[ES] = \frac{es_0K_SK_P}{K_sK_Ps_0 + K_Ps_0^2 + K_mK_Sp} \tag{3.20}$$

Sustituyendo la ecuación (3.19) en la (3.7) resulta:

$$-\frac{dDH}{de} = \frac{k_2(K_SK_Ps_0 + K_Ps_0^2 + K_mK_Sp)}{k_3K_mK_SK_Ps_0}\frac{1}{e} \tag{3.21}$$

Integrando la ecuación (3.21) se obtiene:

$$\int_0^{DH} -dDH = \frac{k_2(K_SK_Ps_0 + K_Ps_0^2 + K_mK_Sp)}{k_3K_mK_SK_Ps_0}\int_{e_0}^{e}\frac{de}{e} \tag{3.22}$$

$$e = e_0 \exp\left[-\frac{k_3K_mK_SK_Ps_0DH}{k_2(K_SK_Ps_0 + K_Ps_0^2 + K_mK_Sp)}\right] \tag{3.23}$$

Además, un conjunto de ecuaciones cinéticas exponenciales, las cuales presentan una relación entre r, s_0 y e_0 pueden ser deducidas a partir de las ecuaciones (3.5), (3.20) y (3.23) como se muestra a continuación:

$$r = s_0\frac{dDH}{dt} = as_0\exp(-bDH) \tag{3.24}$$

$$\frac{dDH}{dt} = aexp\ (-bDH) \tag{3.25}$$

$$DH = \frac{1}{b}\ln(abt + 1) \tag{3.26}$$

Donde los parámetros a y b poseen diferentes expresiones de acuerdo a los diferentes mecanismos de reacción, estas expresiones se muestran en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Expresiones de los parámetros a y b para la ecuación exponencial.

Mecanismo	a	b
Sin inhibición	$\frac{k_2 e_0}{s_0}$	$\frac{k_3 K_m}{k_2}$
Inhibición por sustrato	$\frac{k_2 e_0 K_S}{K_S s_0 + s_0^2}$	$\frac{k_3 K_m K_s}{k_2(K_s + s_0)}$
Inhibición por producto	$\frac{k_2 e_0 K_p}{K_P s_0 + K_m P}$	$\frac{k_3 K_m K_P s_0}{k_2(K_P s_0 + K_m p)}$
Inhibición por sustrato y producto	$\frac{k_2 e_0 K_S K_P}{K_s K_P s_0 + K_P s_0^2 + K_m K_S p}$	$\frac{k_3 K_m K_S K_P s_0}{k_2(K_S K_P s_0 + K_P s_0^2 + K_m K_S p)}$

Fuente: (Qi & He, 2006)

Análogamente si se considera la ecuación (3.5) en términos de formación de producto la velocidad de reacción puede expresarse de la siguiente manera (Espinoza, 2014):

$$r = \frac{dP}{dt} \tag{3.27}$$

Realizando el mismo análisis y las mismas sustituciones se llega a una expresión para la formación de producto que describe la cinética de la reacción:

$$P = \frac{1}{b'}\ln(a'b't + 1) \tag{3.28}$$

En donde los parámetros a y b por ende a' y b' tienen expresiones diferentes de acuerdo con los mecanismos de reacción diferentes y valores diferentes para los mecanismos de reacción

diferentes como muestra la Tabla 3.9. Donde el parámetro a' corresponde a la velocidad inicial de la formación de grupos aminos y el parámetro b tienen que ver con la extensión de la reacción.

Tabla 3.9. Expresiones de los parámetros a' y b' para la ecuación exponencial.

Mecanismo	a'	b'
Sin inhibición	$k_2 e_0$	$\frac{k_3 K_m}{k_2 s_0}$
Inhibición por sustrato	$\frac{k_2 e_0 K_S}{K_S + s_0}$	$\frac{k_3 K_m K_s}{k_2 s_0 (K_s + s_0)}$
Inhibición por producto	$\frac{k_2 e_0 K_p s_0}{K_P s_0 + K_m P}$	$\frac{k_3 K_m K_P}{k_2 (K_P s_0 + K_m p)}$
Inhibición por sustrato y producto	$\frac{k_2 e_0 K_S K_P s_0}{K_s K_P s_0 + K_P s_0^2 + K_m K_S p}$	$\frac{k_3 K_m K_S K_P}{k_2 (K_S K_P s_0 + K_P s_0^2 + K_m K_S p)}$

Fuente: (Espinoza, 2014)

3.6 Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta (MSR), es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas útiles en el modelado y el análisis de problemas en los que una respuesta de interés recibe la influencia de diversas variables y donde el objetivo es principalmente optimizar esta respuesta. En la mayoría de los problemas MSR, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes es desconocida. Por lo tanto, el primer paso de la MSR es encontrar una aproximación adecuada de la verdadera relación funcional entre la respuesta y el conjunto de las variables independientes. Si la respuesta está bien modelada por una función lineal de las variables independientes, entonces la función de aproximación es un modelo de primer orden, y si existe curvatura en el sistema, entonces se puede usar un modelo de segundo orden o superior. En casi todos los problemas MSR se usan modelos ya sea de primer o segundo orden que por lo general es probable que sean una aproximación razonable de la verdadera relación funcional en el espacio completo de las variables independientes, pero para una región relativamente pequeña suelen funcionar bastante bien (Montgomery, 2004).

Independiente si es de primer orden o superior un modelo de superficie de respuesta de manera general puede representarse de la siguiente forma:

$$y = X\beta + \varepsilon \tag{3.29}$$

Dónde y=Matriz de respuesta; X= Matriz de información; β= vector de parámetros de regresión; ε=vector de residuos.

$$y = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{bmatrix}; X = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & \dots & x_{1k} \\ 1 & x_{21} & \dots & x_{2k} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & x_{n1} & \dots & x_{nk} \end{bmatrix}; \beta = \begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \vdots \\ \beta_k \end{bmatrix}; \varepsilon = \begin{bmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \vdots \\ \varepsilon_n \end{bmatrix} \tag{3.30}$$

En general, y es un vector (n x 1) de las observaciones, X es una matriz (n x p) de los niveles de las variables independientes, β es un vector (p x 1) de los coeficientes de regresión, y ε es un vector (n x 1) de los errores aleatorios.

Los parámetros del modelo pueden estimarse de manera más eficiente cuando se emplean los diseños experimentales apropiados para recolectar los datos (Montgomery, 2004) .

3.6.1 Diseño de Experimentos

En muchos experimentos interviene el estudio de los efectos de dos o más factores. En general los diseños factoriales son los más eficientes para este tipo de tratamientos. Por diseño factorial se entiende en que en cada ensayo o réplica completa del experimento se investigan todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores. Por ejemplo, si el factor A tiene a niveles y el factor B tiene b niveles, cada réplica contiene todas las ab combinaciones de los tratamientos. El efecto de un factor se define como el cambio en la respuesta producido por un cambio en el nivel del factor (Montgomery, 2004).

Diseño Central compuesto

Dentro de los diseños más utilizados para ajustar modelos de segundo orden se encuentra el Diseño Central Compuesto o DCC, este es un diseño factorial 2^k o factorial fraccionado 2^{k-1}, con n_F corridas, 2k corridas axiales o estrella y n_C corridas centrales. Hay parámetros de diseño que deben especificarse: la distancia α de las corridas axiales al centro del diseño y el número de puntos centrales n_C. El diseño de experimentos propuesto debe ser rotable, esto quiere decir que para todos los puntos x que están a la misma distancia del centro del diseño, la varianza de la respuesta predicha es la misma. Un diseño central compuesto se hace rotable mediante la elección de α, éste parámetro dependerá del número de puntos en la porción factorial del diseño $\alpha = (n_F)^{\frac{1}{4}}$, donde n_F es el número de puntos usados en la porción factorial del diseño (Montgomery, 2004).

Para el caso de las corridas centrales n_C el diseño debe incluir un cierto número para proporcionar una varianza razonablemente estable en la respuesta predicha. En general se recomiendan de tres a cinco corridas centrales (Montgomery, 2004).

Existen tres tipos de DCC, el diseño central compuesto circunscrito (CCC), inscrito (CCI) y centrado en las caras (CCF). El diseño CCC explora un espacio más grande que el CCI y ambos poseen rotabilidad a diferencia del CCF que no presenta rotabilidad. En la Figura 3.8 se muestran los tres tipos de diseño.

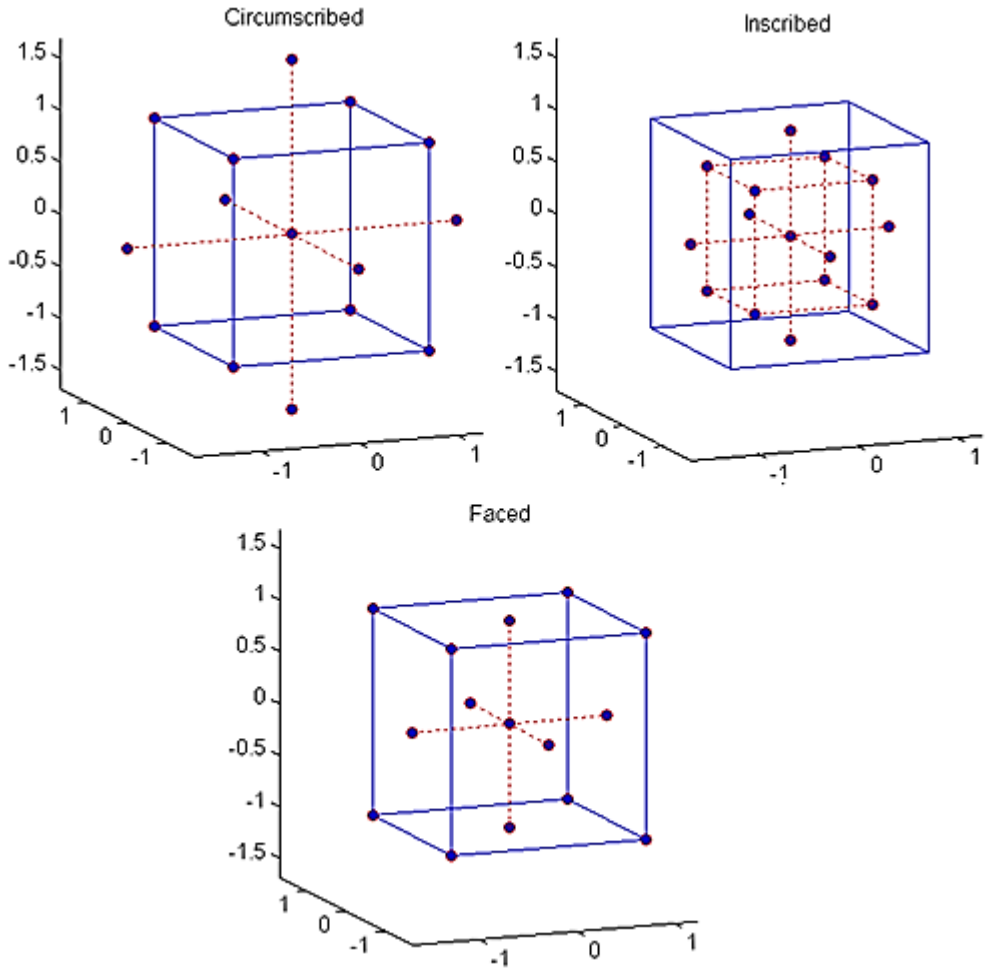

Figura 3.8. Tipos de Diseño Central Compuesto
Fuente: (Mathworks)

Capítulo 4

METODOLOGÍA

4. METODOLOGÍA

La metodología de estudio y modelamiento para caracterizar las diferentes curvas de hidrólisis enzimática de proteína a altas concentraciones de sólidos y sin control de pH, fue la propuesta por Valencia et al., (2015), en la cual se proponen dos niveles de modelamiento. Para este estudio se realizó en un rango de proporción residuo/agua desde 1:1 hasta sólo residuo y sin control de pH, utilizando la enzima Alcalase.

En el primer nivel se ajustó la curva experimental a la ecuación enzimática analizada por Qi & He, la cual posee dos parámetros a' y b', que tiene la particularidad de tener el tiempo como única variable independiente. Para realizar esto fue necesario formular un diseño experimental en el cual se definieron las condiciones de operación, concentración inicial de enzima (E), temperatura (T) y concentración inicial de proteína (S). Una vez fijadas las condiciones de operación se realizaron los experimentos y se obtuvo la curva de hidrólisis bajo la metodología de seguimiento con reactivo OPA. Obtenida la curva de hidrolisis de grupos aminos libres versus tiempo se procedió a calcular los parámetros a' y b' mediante regresión no lineal por mínimos cuadrados ajustándola a la ecuación de Qi y He.

El segundo nivel de modelamiento es para las constantes cinéticas a' y b' obtenidas para cada curva, utilizando una ecuación polinomial de segundo orden basada en la Metodología de superficie de respuesta (MSR), esto permitió establecer la dependencia de los parámetros a' y b' en función de las condiciones de operación.

Paralelamente al modelamiento de las curvas se procedió a medir el porcentaje de extracción de nitrógeno alcanzado y la fracción sobrenadante después de 60 minutos de reacción. El Porcentaje de extracción de nitrógeno indica la cantidad de nitrógeno que en el transcurso de la reacción de hidrólisis pasa (se solubiliza) desde la fase insoluble a la soluble con respecto al nitrógeno total disponible.

Por su parte la fracción sobrenadante es la cuantificación de la masa final de sobrenadante en las muestras con respecto al peso total.

La Figura 4.1. **Esquema de etapas de la metodología de experimentación.**Figura 4.1 refleja el resumen de la metodología de estudio**.**

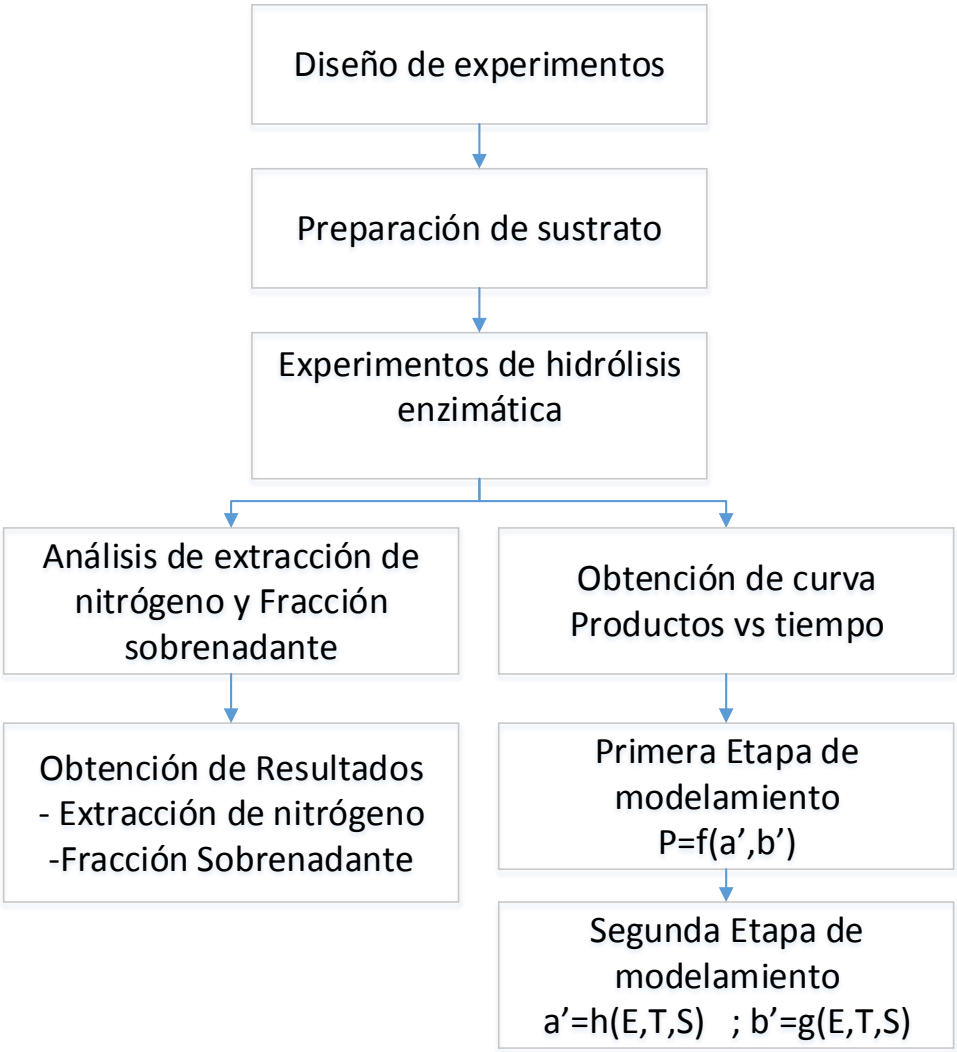

Figura 4.1. Esquema de etapas de la metodología de experimentación.

Además, se compararon hidrólisis realizadas a las mismas condiciones de operación, pero a diferentes condiciones de pH: hidrólisis a pH 8 controlado, hidrólisis a pH 8 ajustado al inicio y sin control, e hidrólisis a pH nativo y sin control.

Finalmente se realizaron los modelamientos correspondientes para realizar una comparación cuantitativa de la hidrólisis bajo las condiciones de pH mencionadas anteriormente y además una comparación entre hidrólisis a distintas concentraciones iniciales de proteína.

4.1 Equipos

Los equipos a utilizados para el procedimiento experimental fueron los siguientes:

Tabla 4.1. Listado de equipos utilizados

Equipo	Marca; Modelo
Baño termorregulador	Thermo, Hake SC 100
Baño termorregulador	Memmert , WNB 7
Rotor para agitación	IKA Eurostar , EURO-ST P CV
Agitador	Fabricación propia
Congelador	Whirlpool , WVT10
Centrífuga	Prism, C2500
Espectrofotómetro	Hewlett, Packard 8453
Termocupla digital tipo K	Sonda, TM902C

El montaje se presenta a continuación:

Figura 4.2. Montaje para los experimentos de hidrólisis.

4.2 Materiales y Reactivos

4.2.1 Sustrato

El sustrato a utilizado fue residuo de merluza cuyos componentes son específicamente espinazo y cabeza de merluza, provenientes de la recolección de residuos generados en Caleta Portales, los cuales fueron procesados mediante corte y posteriormente se molieron. Su composición determinada mediante análisis en laboratorio es la siguiente:

Tabla 4.2. Composición de residuos de merluza

Porcentaje (% en base húmeda)	Mezcla residuos de merluza
Humedad	77,69
Lípidos	7,35
Proteína	5,04
ENN	6,69
Ceniza	3,17
Fibra Cruda	0,06

4.2.2 Enzima

La enzima a utilizada fue la Subtilisina cuya fuente comercial es Alcalase 2,4L FG, una endoproteasa de origen bacteriano que es producida por el Bacillus Licheniformis mediante femerntación sumergida y desarrollada por Novozymes. Su densidad es de 1,25 [mg/mL] y su rango óptimo de temperatura es entre 50 y 70 °C y de pH entre 6 y 10. La proteasa comercial utilizada presenta una actividad de 3000 [mAU/g] y es un líquido de color café.

4.3 Diseño del Reactor

Las dimensiones del reactor fueron diseñadas bajo los criterios recomendados para el diseño de fermentadores, de acuerdo a (Acevedo et al., 2004). El esquema presentado en la figura muestra las dimensiones del reactor y del agitador. El material utilizado para el reactor fue vidrio y para el agitador acero inoxidable.

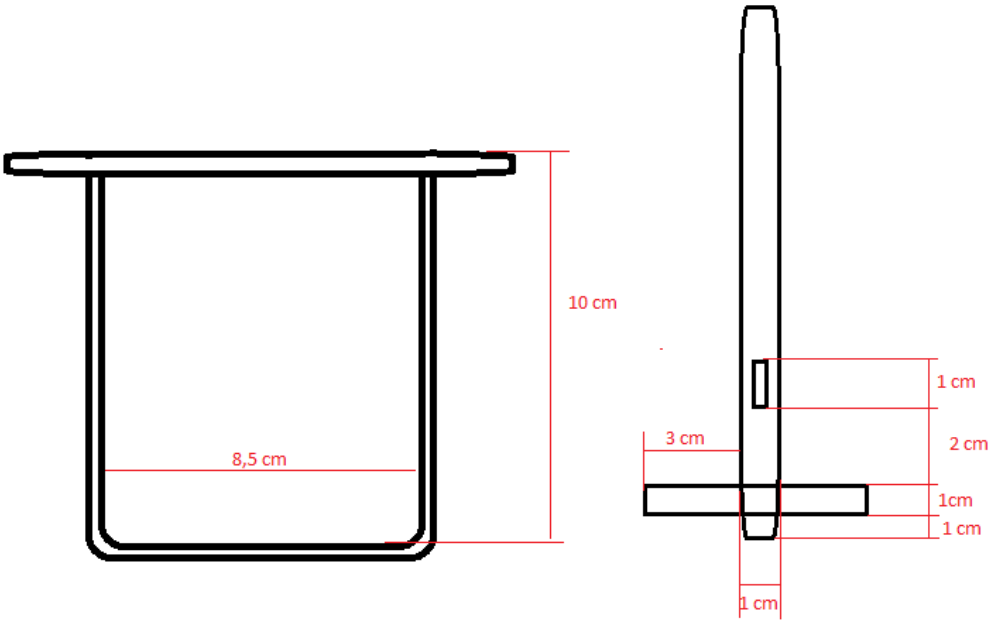

Figura 4.3. Esquema de las dimensiones de Reactor y Agitador para operar a altas concentraciones de sólidos.

4.4 Experimentos de hidrólisis enzimática

4.4.1 Preparación de sustrato

Una vez que el residuo de merluza fue molido, se pesó y envasó en bolsas de plástico con cierre hermético con la cantidad necesaria a utilizar en cada experimento, después de envasar, las bolsas se congelaron hasta su utilización posterior.

La cantidad de pescado molido utilizada en cada experimento viene dada por el factor “concentración inicial de proteína” determinado en el diseño de experimental.

4.4.2 Hidrolisis de sustrato

Para comenzar la reacción de hidrolisis fue necesario que el sistema dentro del reactor alcanzara la temperatura deseada, luego se procedió a añadir enzima, dando inicio a la reacción de hidrólisis.

Las muestras utilizadas para la obtención de la curva de grupos amino libres versus tiempo se tomaron en los tiempos: 0, 1, 2, 4 ,8 ,12, 20, 30, 45 y 60 minutos de iniciada la reacción. Cada muestra esta se inactivó térmicamente a 85°C, durante 15 minutos. Esto se hizo con el propósito de terminar la reacción de hidrólisis y que no se sigan liberando más grupos α-aminos de los que ya hay en cada muestra para no afectar la medición.

4.4.3 Diseño de experimento

Para ambos niveles de modelamiento se utilizó un diseño CCC (central compuesto circunscrito) el cual determina el número y la configuración de los experimentos a realizar. Se planteó un diseño factorial de 3^3, para este tipo de configuración son necesarios 5 niveles para cada uno de los tres factores y 17 experimentos de los cuales 3 réplicas son del punto central. Los factores del diseño son concentración inicial de enzima (E) en [mUA/g], temperatura de reacción (T) en [°C] y concentración inicial de proteína (S) en % masa/masa de proteína. El diseño utilizado se muestra en la Tabla 4.4.

Tabla 4.3. Factores y niveles de operación según diseño de experimento CCC.

		Niveles				
Factor	**Unidad**	-1,68	-1	0	1	1,68
T	**[°C]**	38,2	45	55	65	71,8
E	**[mUa/g]**	0,62	3	6,5	10	12,38
S	**%[m/m]**	2,52	3,03	3,78	4,53	5,04

Tabla 4.4. Diseño de Experimento CCC y valores de los factores.

	CODIFICADA			Reales		
	T	E	S	T	E	S
Experimento	X1	X2	X3	[°C]	[mUa/g]	%[m/m]
1	-1,00	-1,00	-1,00	45	3	3,03
2	1,00	-1,00	-1,00	65	3	3,03
3	-1,00	1,00	-1,00	45	10	3,03
4	1,00	1,00	-1,00	65	10	3,03
5	-1,00	-1,00	1,00	45	3	4,53
6	1,00	-1,00	1,00	65	3	4,53
7	-1,00	1,00	1,00	45	10	4,53
8	1,00	1,00	1,00	65	10	4,53
9	0,00	0,00	-1,68	55	6,5	2,52
10	0,00	0,00	1,68	55	6,5	5,04
11	0,00	-1,68	0,00	55	0,62	3,78
12	0,00	1,68	0,00	55	12,38	3,78
13	-1,68	0,00	0,00	38,2	6,5	3,78
14	1,68	0,00	0,00	71,8	6,5	3,78
15	0,00	0,00	0,00	55	6,5	3,78
16	0,00	0,00	0,00	55	6,5	3,78
17	0,00	0,00	0,00	55	6,5	3,78

4.4.4 Obtención de Curvas de Hidrólisis.

Para obtener la curva de hidrólisis de cada experimento se analizaron las muestras tomadas durante los experimentos de hidrólisis. En donde el producto son los grupos α-amino ácidos formados durante la reacción, los cuales se midieron utilizando el reactivo OPA como describe el protocolo 8.1.3 en Anexos. Para obtener la cantidad de grupos aminos liberados, se debió restar a todas las muestras la cantidad de grupos aminos libres presentes en el tiempo t=0.

Una vez determinada la cantidad de grupos α-aminos presentes en cada muestra, se graficó el avance de la reacción de hidrólisis obteniéndose una curva como la que se muestra en la Figura 4.4 a modo de ejemplo.

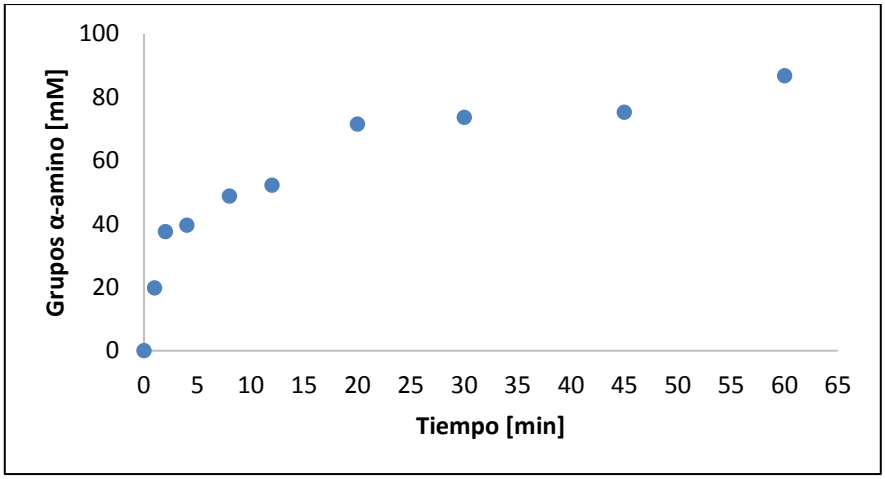

Figura 4.4. Ejemplo de curva hidrólisis, muestra los grupos aminos liberados en función del tiempo

4.4.5 Primer nivel de modelamiento

<u>Estimación de parámetros a y b.</u>

A partir de las curvas obtenidas experimentalmente se realizó un ajuste a la ecuación de Qi & He anteriormente mencionada. Para realizar este ajuste se minimizó la suma de cuadrados de los errores de predicción SS_e. Para eso se utiliza la herramienta Solver del software Excel. La sumatoria de los errores de predicción se puede expresar como:

$$SS_e = \sum (P_e - P_m)^2 \tag{4.1}$$

Donde P_e, representa los datos experimentales del Producto, y P_m equivale al producto arrojado según el modelo logarítmico.

De este ajuste se obtienen los parámetros a' y b'. Para cada parámetro existe un error de estimación el cual se denomina error estándar y se calcula según:

$$error\ estandar = (se) = \sqrt{\hat{\sigma}^2 C_{jj}} \tag{4.2}$$

Donde C_{jj} es el elemento (jj)-ésimo o la diagonal de la matriz de dispersión $(X'X)^{-1}$ y σ^2 es el estimador de la varianza se calcula de la siguiente forma:

$$\sigma^2 = MSE = \frac{SSe}{n-p} \tag{4.3}$$

Donde $(n-p)$ son los grados de libertad.

Además, se realizó una prueba de significancia del parámetro estimado, donde, si el estadístico t_0 cumple que $t_0 > t_{\frac{\alpha}{2};(n-p)}$, entonces el parámetro es significativo.

4.4.6 Segundo nivel de modelamiento

<u>Metodología de superficie de respuesta MSR</u>

Una vez obtenidos los parámetros a' y b' para todos los experimentos, se modelaron estos parámetros en función de las condiciones de operación en una ecuación de segundo orden considerando los efectos principales y las interacciones entre las variables.

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \tag{4.4}$$

Donde y es la variable dependiente en este caso los parámetros a' y b'. β_i son los coeficientes de la regresión lineal, cuadrática y de las interacciones, y finalmente x_i, x_j son las variables independientes o condiciones de operación (E), (T) y (A) expresadas como unidades no codificadas, o x_1 , x_2 y x_3 como unidades codificadas respectivamente.

<u>Regresión para MSR</u>

Él método de los mínimos cuadrados se usa de manera típica para estimar los coeficientes de regresión de un modelo de regresión lineal múltiple. Este consiste en elegir las β de la ecuación (4.4) de tal modo que la suma de los cuadrados de los errores ε_i se minimice

(Montgomery, 2004). El modelo en términos matriciales puede escribirse como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\boldsymbol{y} = \boldsymbol{X\beta} + \boldsymbol{\varepsilon} \tag{4.5}$$

Dónde y es la matriz de respuesta (n x 1); X es la Matriz de información (n x p); β vector de parámetros de regresión (p x 1); ε es el vector de residuos o errores (n x 1).

$$\boldsymbol{y} = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{bmatrix}; \boldsymbol{X} = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & \dots & x_{1k} \\ 1 & x_{21} & \dots & x_{2k} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 1 & x_{n1} & \dots & x_{nk} \end{bmatrix}; \boldsymbol{\beta} = \begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \vdots \\ \beta_k \end{bmatrix}; \boldsymbol{\varepsilon} = \begin{bmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \vdots \\ \varepsilon_n \end{bmatrix} \tag{4.6}$$

Como se mencionó anteriormente, el método de los mínimos cuadrados quiere encontrar el vector β de modo que minimice la suma de los errores, es decir:

$$L = \sum_{i=1}^{n} \varepsilon_i^2 = \boldsymbol{\varepsilon}'\boldsymbol{\varepsilon} = (\boldsymbol{y} - \boldsymbol{X\beta})'(\boldsymbol{y} - \boldsymbol{X\beta}) \tag{4.7}$$

L además se puede expresar como:

$$L = \boldsymbol{y}'\boldsymbol{y} - \boldsymbol{\beta}'\boldsymbol{X}'\boldsymbol{y} - \boldsymbol{y}'\boldsymbol{X}'\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\beta}'\boldsymbol{X}'\boldsymbol{X\beta} \tag{4.8}$$

$$L = \boldsymbol{y}'\boldsymbol{y} - \boldsymbol{2\beta}'\boldsymbol{X}'\boldsymbol{y} + \boldsymbol{\beta}'\boldsymbol{X}'\boldsymbol{X\beta} \tag{4.9}$$

Ya que $\boldsymbol{\beta}'\boldsymbol{X}'\boldsymbol{y}$ es una matriz (1x1), o un escalar, y su transpuesta $(\boldsymbol{\beta}'\boldsymbol{X}'\boldsymbol{y}')' = \boldsymbol{y}'\boldsymbol{X\beta}$ es el mismo escalar. Los estimadores de mínimos cuadrados deben satisfacer que:

$$\left.\frac{\partial L}{\partial \boldsymbol{\beta}}\right|_{\hat{\beta}} = -2\boldsymbol{X}'\boldsymbol{y} + 2\boldsymbol{X}'\boldsymbol{X}\widehat{\boldsymbol{\beta}} = \boldsymbol{0} \tag{4.10}$$

De modo más simple:

$$\boldsymbol{X'X\widehat{\beta}} = \boldsymbol{X'y} \tag{4.11}$$

Esta es la forma matricial de las ecuaciones normales de mínimos cuadrados, las cuales sirven para obtener los parámetros. Para resolver esta ecuación normal matricial, ambas partes de la ecuación se multiplican por la inversa de $\boldsymbol{X'X}$ resultando:

$$\widehat{\boldsymbol{\beta}} = (\boldsymbol{X'X})^{-1}\boldsymbol{X'y} \tag{4.12}$$

El modelo ajustado finalmente es:

$$\hat{y} = X\hat{\beta} \tag{4.13}$$

Y en notación escalar el modelo ajustado es:

$$\widehat{y_i} = \hat{\beta}_0 + \sum_{i=1}^{k} \hat{\beta}_j x_{ij} \quad i = 1,2,\dots,n \tag{4.14}$$

<u>Prueba de hipótesis en la regresión múltiple</u>

Para medir la utilidad del modelo obtenido, se realizan ciertas pruebas de hipótesis a la regresión. Para que esta prueba sea válida sin embargo es necesario que los errores del modelo ε_i sigan una distribución normal e independiente con media cero y varianza σ^2, lo cual se abrevia como $\varepsilon \sim NID(0, \sigma^2)$. Como resultado de este supuesto, las observaciones y_i tienen una distribución normal e independiente con media $\beta_0 + \sum_{j=1}^{k} \beta_j x_{ij}$ y varianza σ^2 (Montgomery, 2004).

Prueba de significación de la regresión

La prueba de significancia de la regresión se utiliza para determinar si existe una relación lineal entre la variable de respuesta y un subconjunto de los regresores $x_1, x_2, \dots . x_k$. Las hipótesis apropiadas son:

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \cdots = \beta_k = 0 \tag{4.15}$$

$$H_1: \beta_j \neq 0 \; para \; al \; menos \; una \; j \tag{4.16}$$

Esto se traduce básicamente en que rechazar la hipótesis nula (H_0) significa que al menos uno de los regresores $x_1, x_2, \dots . x_k$ contribuye al modelo de manera significativa. El procedimiento de prueba incluye un análisis de varianza en el que se hace la partición de la suma de cuadrados total SS_T en uns suma de cuadrados debida al modelo SS_R y la suma de cuadrados debida a los residuales SS_e, es decir:

$$SS_T = SS_R + SS_e \tag{4.17}$$

El procedimiento de prueba para rechazar la hipótesis nula consiste en calcular F_0como se muestra a continuación:

$$F_0 = \frac{\frac{SS_R}{k}}{\frac{SS_e}{n-k-1}} = \frac{MS_R}{MS_e} \tag{4.18}$$

Y rechazar H_0 si F_0 excede a $F_{\alpha,k,(n-k-1)}$. De manera alternativa se puede usar el enfoque del valor P, para la prueba de hipótesis, y por lo tanto, rechazar H_0 si el valor P del estadístico F_0es menor que α (significancia). Para realizar este procedimiento se utiliza una tabla conocida como tabla de análisis de varianza, tal como se muestra en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Análisis de varianza de la significación de la regresión múltiple

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F_0
Regresión	SS_R	k	MS_R	$\frac{MS_R}{MS_e}$
Error o residual	SS_e	$n-k-1$	MS_e	
Total	SS_T	$n-1$		

Las diversas sumas pueden calcularse a partir de:

$$SS_R = \widehat{\boldsymbol{\beta}}'\boldsymbol{X}'\boldsymbol{y} - \frac{(\sum_{i=1}^{n} y_i)^2}{n} \tag{4.19}$$

$$SS_e = \boldsymbol{y}'\boldsymbol{y} - \widehat{\boldsymbol{\beta}}'\boldsymbol{X}'\boldsymbol{y} \tag{4.20}$$

$$SS_T = \boldsymbol{y}'\boldsymbol{y} - \frac{(\sum_{i=1}^{n} y_i)^2}{n} \tag{4.21}$$

El coeficiente de determinación múltiple R^2, es una medida de la cantidad de reducción en la variabilidad de y que se obtiene al utilizar las variables de regresión $x_1, x_2, \dots, x_k$ en el modelo. Este se calcula como se muestra en la siguiente ecuación:

$$R^2 = \frac{SS_R}{SS_T} = 1 - \frac{SS_e}{SS_T} \tag{4.22}$$

Un valor grande de R^2 no implica necesariamente que el modelo de regresión sea adecuado, ya que cada vez que se agregue una variable al modelo R^2 incrementará su valor, independientemente si la variable añadida es significativa o no. Esto puede generar que un modelo con un R^2 muy alto genera respuestas o estimaciones alejadas de la respuesta media. Para evitar este efecto se utiliza el $R^2_{ajustado}$, el cual está definido como:

$$R^2_{ajustado} = \frac{1 - \frac{SS_e}{n-p}}{\frac{SS_T}{n-1}} = 1 - \frac{n-1}{n-p}(1 - R^2) \tag{4.23}$$

La particularidad de este coeficiente es que no siempre se incrementará cuando se agreguen variables al modelo, por el contrario, si se agregan términos innecesarios al modelo el valor de este comenzará a disminuir.

Pruebas de los coeficientes de regresión individuales

Un modelo puede ser más eficaz en su predicción ya sea con la inclusión de una variable adicional, o también con la eliminación de una de las variables que ya están en el modelo y cuyo aporte en comparación con los demás parámetros es poco significativo.

Para probar la significancia de cualquier coeficiente de regresión individual, se plantea la hipótesis siguiente:

$$H_0: \beta_j = 0 \tag{4.24}$$

$$H_1: \beta_j \neq 0 \tag{4.25}$$

Si $H_0: \beta_j = 0$ no se rechaza, entonces esto implica que x_j puede eliminarse del modelo. El estadístico de prueba para esta hipótesis es:

$$t_0 = \frac{\widehat{\beta}_j}{\sqrt{\sigma^2 C_{jj}}} \tag{4.26}$$

Donde C_{jj} es el elemento de la diagonal de $(\boldsymbol{X}'\boldsymbol{X})^{-\mathbf{1}}$ correspondiente a $\hat{\beta}$. La hipótesis nula se rechaza si $|t_0| \geq t_{\frac{\alpha}{2},(n-k-1)}$. Esto es una prueba parcial ya que el coeficiente de regresión $\hat{\beta}$ depende de todos los demás regresores $x_i (i \neq j)$ que están en el modelo.

Estimación de la varianza $\boldsymbol{\sigma^2}$

Para desarrollar un estimador de la varianza, se debe considerar la suma de cuadrados de los residuales, por ejemplo:

$$SS_e = \sum_{i=1}^{n} (y_i - \hat{y}_i)^2 = \sum_{i=1}^{n} e_i^2 = \boldsymbol{e}'\boldsymbol{e} \tag{4.27}$$

Si se sustituye $e = y - \hat{y} = \boldsymbol{y} - \boldsymbol{X}\widehat{\boldsymbol{\beta}}$, se tiene:

$$SS_e = \boldsymbol{y}'\boldsymbol{y} - \boldsymbol{2}\widehat{\boldsymbol{\beta}}'\boldsymbol{X}'\boldsymbol{y} + \widehat{\boldsymbol{\beta}}'\boldsymbol{X}'\boldsymbol{X}\widehat{\boldsymbol{\beta}} \tag{4.28}$$

Dado que $\boldsymbol{X}'\boldsymbol{X}\widehat{\boldsymbol{\beta}} = \boldsymbol{X}'\boldsymbol{y}$**,** esta última ecuación queda como:

$$SS_e = \boldsymbol{y}'\boldsymbol{y} - \widehat{\boldsymbol{\beta}}'\boldsymbol{X}'\boldsymbol{y} \tag{4.29}$$

Esta última ecuación se llama suma de cuadrados residual, y tiene $n - p$ grados de libertad asociados con ella. Puede demostrarse que:

$$E(SS_e) = \sigma^2(n - p) \tag{4.30}$$

Por lo que un estimador insesgado de σ^2esta dado por:

$$\sigma^2 = \frac{SS_e}{n - p} \tag{4.31}$$

El proceso de regresión y obtención de los parámetros, junto con las pruebas de significancia del modelo y de los coeficientes individuales, más el cálculo del coeficiente de determinación múltiple R^2. Se realizan en software computacional de hojas de cálculo. El algoritmo para la obtención del modelo final es una combinación de los resultados entregados por el programa, más el análisis de los resultados entregados para que el programa realice el procedimiento cuantas veces sea necesario para estimar el modelo final, la Figura 4.5**¡Error! No se encuentra**

el origen de la referencia. muestra el algoritmo utilizado para la obtención del modelo ajustado.

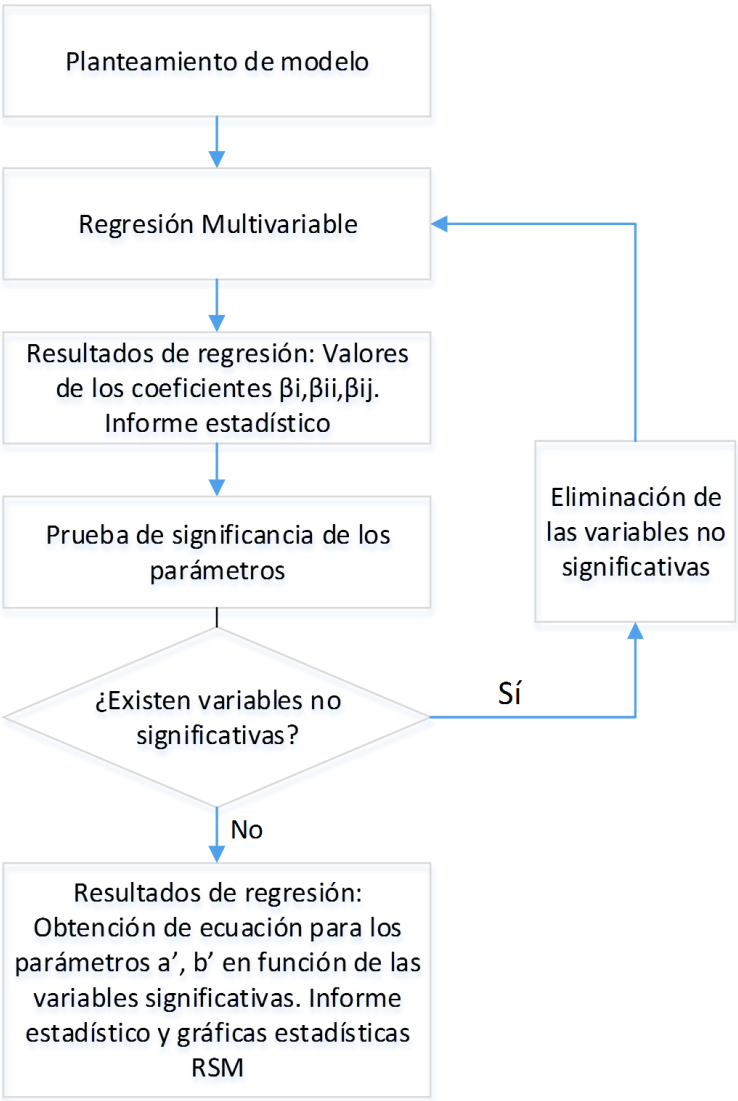

Figura 4.5. Algoritmo de obtención del modelo

Verificación de la adecuación del modelo

Para confirmar que se validan los supuestos del modelo: distribución normal e independiente con media cero y varianza σ^2 constante pero desconocida, se analizan los residuos del modelo.

Los residuos se definen como:

$$e = y - \hat{y} \tag{4.32}$$

Donde y son los valores observados y $\hat{y}$ corresponde a los valores ajustados.

Los análisis de residuos pueden ser efectuados mediante gráficas de residuos, en un modelo de regresión deberán examinarse siempre estas gráficas. Se analizaron las gráficas de probabilidad normal, en donde se espera que los residuos tengan una apariencia de línea recta, además se analizó la gráfica de residuales versus los valores ajustados en donde se espera que los residuales no posean una estructura; en particular, no deberán estar relacionados con ninguna otra variable, incluyendo la respuesta predicha (Montgomery, 2004).

4.5 Determinación de Porcentaje de extracción de nitrógeno.

Se define la extracción de nitrógeno como la razón entre el nitrógeno presente en el sobrenadante de un hidrolizado, con respecto al nitrógeno total disponible. Al producirse la ruptura de los enlaces peptídicos se liberan grupos α-aminos al medio soluble. Cuando se realiza una hidrólisis total, los moles de grupos α-aminos ácidos presentes en el medio son aproximadamente igual a la cantidad de moles de nitrógeno presente en la muestra, de modo que para determinar el porcentaje de nitrógeno se cuantifica por medio de los grupos α-amino.

El porcentaje de extracción de nitrógeno se determinó por la cantidad de grupos α-aminos presentes en el sobrenadante o fase soluble del hidrolizado después de una hidrólisis total, dividido por la cantidad de nitrógeno total presente en el sistema.

$$\%\ Extracción\ de\ N = \frac{grupos\ \alpha - amino\ solubles}{Nitrógeno\ total\ presente} * 100 \qquad (4.33)$$

Si se considera que la concentración de grupos α-amino es igual a la concentración de nitrógeno después de realizar la hidrólisis total, este porcentaje se puede expresar como:

$$\%Extracción\ de\ N = \frac{\left(\frac{N[mM]}{10^6} \cdot PM_N \left[\frac{g_N}{mol_N}\right] \cdot 350[g_{hidrolizado}] \cdot F\right)}{\frac{MR[g] \cdot \%P}{6{,}25\left[\frac{g_{proteína}}{g_N}\right]}} \cdot 100 \qquad (4.34)$$

Donde:

N: $concentración\ de\ nitrógeno\ en\ sobrenadante[mM]$

PM_N: $Peso\ Molecular\ del\ nitrógeno.$

F: $fracción\ soluble\ \left[\frac{g_{fasesoluble}}{g_{hidrolizado}}\right]$

MR: $Masa\ de\ Residuo\ utilizado\ [g]$

$\%P = porcentaje\ de\ proteína\ presente\ en\ el\ residuo\ \left[\frac{g_{proteína}}{g_{Residuo}}\right]$

4.6 Comparación de tratamientos de pH.

Se realizaron tres experimentos que se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones de concentración inicial de enzima, temperatura y concentración inicial de proteína. Estos experimentos tuvieron una duración de 60 minutos bajo las condiciones que se muestran en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Experimentos para comparación de grupos α-aminos liberados bajo distintas condiciones de pH.

Experimento	E [mUA/g]	T [°C]	S [%w/w]	pH
1	6,5	55	2,52	pH 8 constante
2	6,5	55	2,52	pH inicial 8
3	6,5	55	2,52	sin control de pH

El objetivo de estos experimentos fue cuantificar las diferencias obtenidas en la liberación de grupos α-amino en la reacción de hidrólisis cuando ésta se desarrolla bajo diferentes condiciones de pH. Cada uno de estos experimentos se realizará en duplicado. Y posteriormente se analizará por una prueba t pareada si existen diferencias significativas entre los tratamientos.

Además, se realizó una comparación de los parámetros del modelo logarítmico para verificar si existen diferencias significativas entre los parámetros del modelo.

4.7 Comparación de Energía de secado y eficiencia de productividad.

A modo de realizar una comparación estimativa de la energía necesaria para la etapa de secado, se tomaron 2 casos bases donde a partir de los datos experimentales y modelos obtenidos, se calculó el calor necesario para calentar y retirar el agua del sobrenadante obtenido, la cantidad de hidrolizado resultante, el calor necesario para producir un gramo de hidrolizado en la fase de secado y la productividad del proceso en gramos de hidrolizado producido por minuto. La comparación considera Para el caso 1: experimentos de hidrólisis realizados 55°C, con una concentración inicial de enzima de 6,5 [mUA/g] y a concentración inicial de proteína de: (a) 2,52 %[w/w]; (b) 3,78 %[w/w]; (c) 5,04 %[w/w]. Y para el caso 2: Experimentos realizados a 55°C; a una concentración inicial de enzima de 6,5 [mUA/g], y concentración inicial de proteína de 2,52 % [w/w] pero para las condiciones de pH mencionadas en el ítem 4.6.

A partir de los datos experimentales obtenidos se utilizaron los parámetros obtenidos a' y b' provenientes del primer nivel de modelamiento. Luego se determinó la concentración de grupos aminos liberados después de 60 minutos de reacción con el modelo logarítmico de Qi & He a partir de los parámetros obtenidos. Sobre la base de un lote de hidrolizado de 350 [gr] se obtienen la masa de sobrenadante obtenida que es equivalente al volumen de sobrenadante por tratarse principalmente de agua.

A partir del grado de hidrólisis calculado, se estimó por una correlación el porcentaje de extracción de nitrógeno, el cual permite determinar la cantidad de proteína presente en el sobrenadante.

El grado de hidrólisis además permite estimar el largo de la cadena peptídica promedio (PCL) (Kristinsson & Rasco, 2000) por sus siglas en inglés, en el cual se indica que en una reacción de hidrólisis el largo promedio de las cadenas de péptido que lo componen dependen del grado de hidrólisis alcanzado como muestra la Figura 4.6, por su parte el PCL se estima como muestra la siguiente ecuación:

$$PCL = \frac{100}{\%DH} \tag{4.35}$$

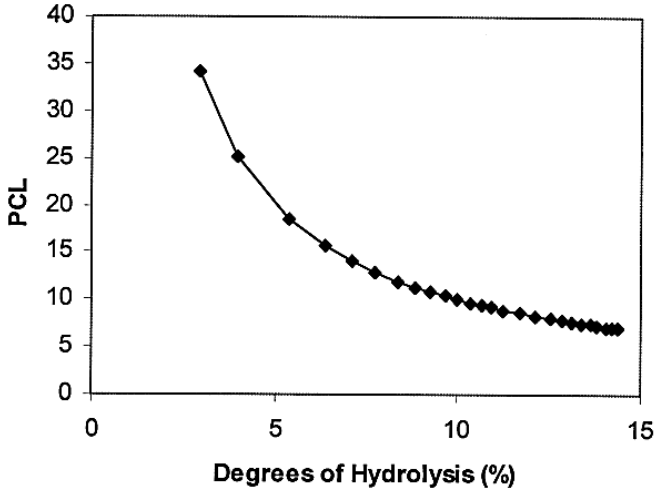

Figura 4.6. Correlación entre el tamaño promedio de proteína y el grado de hidrólisis.

Determinado la cantidad de nitrógeno presente en el sobrenadante se multiplicó el factor $6{,}25\left[\frac{g_{proteína}}{g_{nitrógeno}}\right]$ para calcular la masa de hidrolizado presente en el sobrenadante y la cantidad de agua a retirar. Posteriormente se calculó los calores correspondientes a la fase de calentamiento más el calor de cambio de fase del agua. Como muestra la siguiente ecuación:

$$Q_{tot} = Q_{sensible} + Q_{latente} \tag{4.36}$$

$$Q_{total} = m_{sobrenadante} \cdot Cp_{agua} \cdot \left(100 - T_{experimento}\right) + m_{agua} \cdot \lambda_{agua} \tag{4.37}$$

Donde:

$Cp_{agua} = 4{,}184 \left[\frac{kJ}{kg \cdot K}\right]$

$\lambda_{agua} = 2257 \left[\frac{kJ}{kg}\right]$

$m_{agua} = m_{sobrenadante} - m_{hidrolizado}$

$m_{hidrolizado}$: $masa\ de\ hidrolizado\ seco\ después\ de\ secar.$

Para afectos prácticos y comparativos no se considera la fase de deshidratación característico en un proceso de secado. Además, se asume que el calor específico de la mezcla es el calor específico del agua. La temperatura inicial en la fase de calentamiento es la temperatura de reacción.

Capítulo 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Hidrólisis enzimática

Según la metodología propuesta se llevaron a cabo experimentos de hidrólisis enzimática basados en el diseño CCC. Se obtuvieron 17 curvas experimentales de grupos aminos libres en función del tiempo. A continuación, se presenta en la Tabla 5.1 un resumen de los resultados obtenidos para cada experimento después de 60 minutos de reacción en conjunto con el grado de hidrólisis alcanzado.

Tabla 5.1. Grupos aminos libres y grado de hidrólisis después de 60 minutos de reacción.

Exp	T	E	S	Masa de Residuo	Grupos amino	%DH Experimental
	[°C]	[mUA/g]	% [m/m]	[g]	[mM]	[%]
1	45	3	3,03	210,4	108,2	25,1
2	65	3	3,03	210,4	104,8	20,5
3	45	10	3,03	210,4	155,6	36,6
4	65	10	3,03	210,4	92,8	18,6
5	45	3	4,53	314,6	172,3	14,0
6	65	3	4,53	314,6	121,3	10,4
7	45	10	4,53	314,6	188,0	19,5
8	65	10	4,53	314,6	176,9	16,6
9	55	6,5	2,52	175,0	112,0	33,6
10	55	6,5	5,04	350,0	186,3	8,4
11	55	0,62	3,78	262,5	130,7	15,9
12	55	12,38	3,78	262,5	168,6	25,6
13	38,2	6,5	3,78	262,5	110,8	15,9
14	71,8	6,5	3,78	262,5	86,8	10,5
15	55	6,5	3,78	262,5	164,6	24,6
16	55	6,5	3,78	262,5	142,1	20,4
17	55	6,5	3,78	262,5	160,2	21,4

Se observa que para el experimento 10, realizado a 5,04% de concentración inicial de proteína el cual se logra utilizando sólo residuo de pescado sin añadir agua, se obtiene el grado de hidrólisis más bajo en comparación con los demás experimentos. Por su contraparte el experimento 9 con una proporción de residuo/agua de 1:1, obtuvo el grado de hidrólisis más alto observado. Se infiere a partir de los resultados que se muestran en la Tabla 5.1 que a concentraciones iniciales de proteínas más bajas se obtienen grados de hidrólisis más altos y viceversa. Un efecto contrario se observa para los grupos alfa aminos.

Paralelamente, se registró la diferencia entre el pH inicial y final para las reacciones de hidrólisis enzimáticas llevadas a cabo según el diseño experimental. Los resultados se muestran en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Diferencia entre pH inicial y final después de 60 minutos de reacción.

	Condición de operación					
	T	E	S			
Exp	°C	mUA/g	% w/w	pH Inicial	pH Final	ΔpH
1	45	3	3,03	6,453	6,340	0,113
2	65	3	3,03	6,124	5,936	0,188
3	45	10	3,03	6,335	6,231	0,104
4	65	10	3,03	5,940	N.R	--
5	45	3	4,53	N.R	6,250	--
6	65	3	4,53	6,088	5,950	0,138
7	45	10	4,53	6,074	5,848	0,226
8	65	10	4,53	6,288	6,197	0,091
9	55	6,5	2,52	6,320	6,123	0,197
10	55	6,5	5,04	6,211	6,069	0,142
11	55	0,62	3,78	6,310	6,267	0,043
12	55	12,38	3,78	6,191	5,994	0,197
13	38,2	6,5	3,78	6,316	6,239	0,077
14	71,8	6,5	3,78	6,060	5,817	0,243
15	55	6,5	3,78	6,230	6,095	0,135
16	55	6,5	3,78	6,047	5,860	0,187
17	55	6,5	3,78	6,178	6,012	0,166

*N. R: no se registró

La disminución promedio en el pH para los distintos experimentos fue de $0{,}149$. La máxima disminución se presentó en el experimento 14, el cual se realizó a 72°C con una disminución de 0,243. La mínima disminución la presentó el experimento 11, el cual fue llevado a cabo a 0,62 [mUA/g].

Se realizó una gráfica de ΔpH en función del DH% y de los grupos aminos libres, para ver si existe alguna correlación o dependencia, las gráficas se muestran en la Figura 5.1.

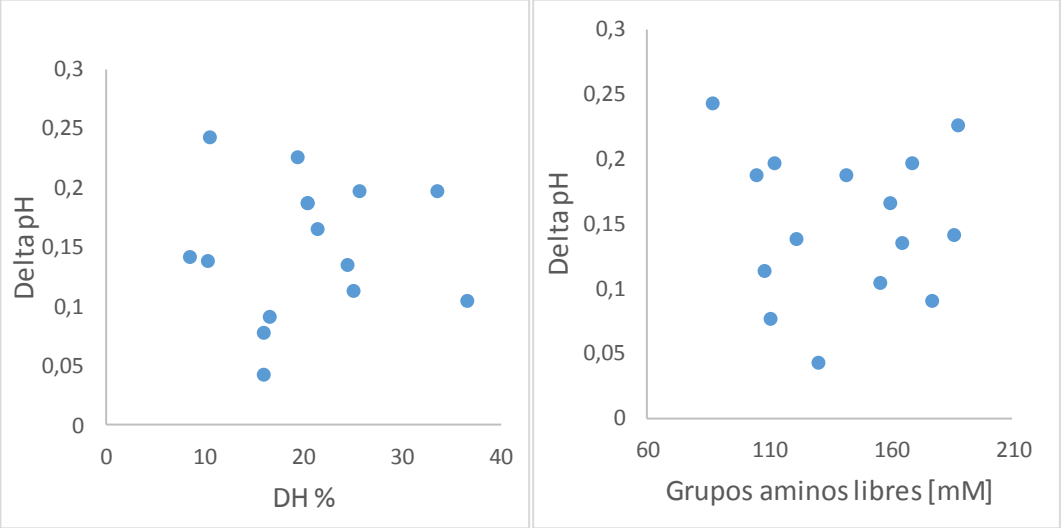

Figura 5.1. Correlación entre diferencia de pH en respecto del DH% y de los grupos aminos formados.

Se observa que la correlación entre el cambio de pH en cada experimento respecto al grado de hidrólisis y grupos aminos formados después de 60 minutos de reacción es baja, lo cual no permite establecer una dependencia del cambio de pH con respecto a las variables mencionadas. Esto se puede explicar debido a la amortiguación de pH que posee cada mezcla, ya que, dependiendo de las características de la mezcla, entre ellas la concentración de sustrato, un cambio en la concentración o avance de la reacción no se reflejará de manera similar en el cambio de pH.

Como se observa el pH al inicio de la reacción no es el mismo para todas las muestras a pesar de que todos provienen de la misma materia prima. Ésta diferencia en el pH inicial se puede explicar por la extensión de la reacción de autolisis generada en la fase previa a la reacción estudiada, debido a que, para alcanzar la temperatura de cada experimento, se necesitó de mayor tiempo para los experimentos a mayor temperatura, y viceversa. En este tiempo de preparación las enzimas presentes en la materia prima hidrolizaron parte de las proteínas

presentes en el sistema, lo que se traduce en que no todas las muestran tenían el mismo pH al inicio de la reacción a pesar de provenir todas de la misma fuente e igual preparación. La autólisis fue constatada en experimentos preliminares (datos no mostrados).

5.1.1 Primer nivel de modelamiento

Con la obtención de los puntos experimentales de las curvas de hidrólisis se procedió a la primera etapa de modelamiento en donde se realiza el ajuste del modelo de Qi & He (Ecuación 3.28) a los datos experimentales. Se muestran a continuación desde la Figura 5.2 hasta la Figura 5.5 las curvas obtenidas experimentalmente en conjunto con el modelo ajustado.

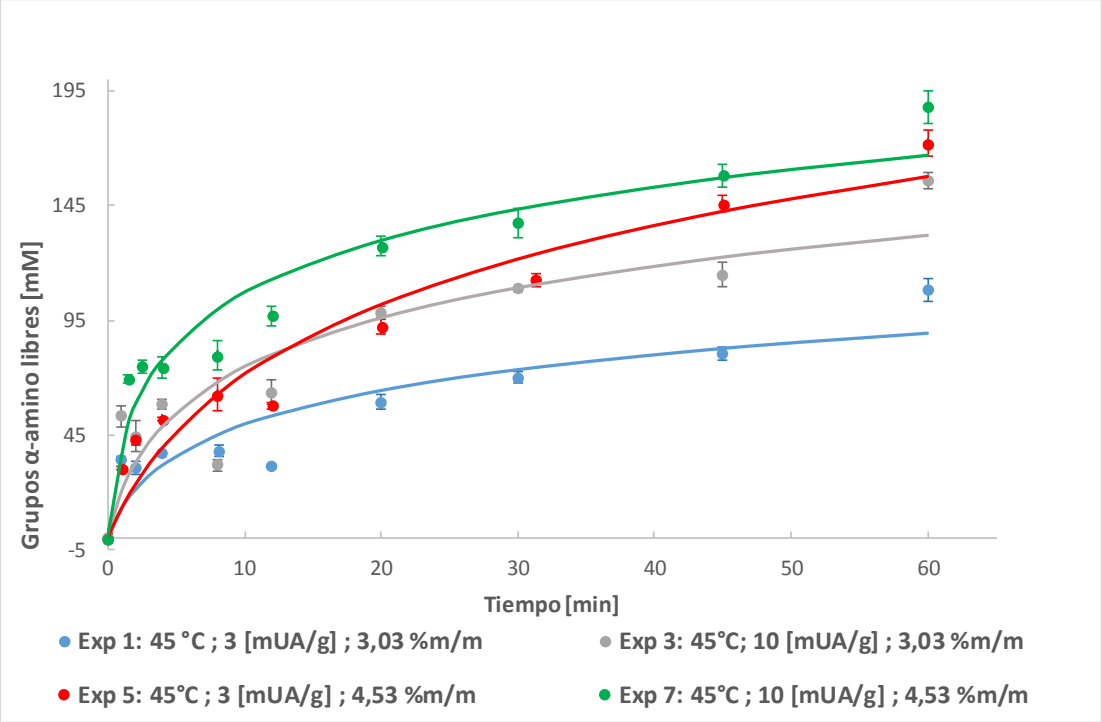

Figura 5.2. Curvas de hidrólisis de residuos de merluza con Alcalase donde se muestran los grupos alfa-amino en función del tiempo para los experimentos del diseño CCC. Los puntos corresponden a datos experimentales y las líneas al modelo ajustado.

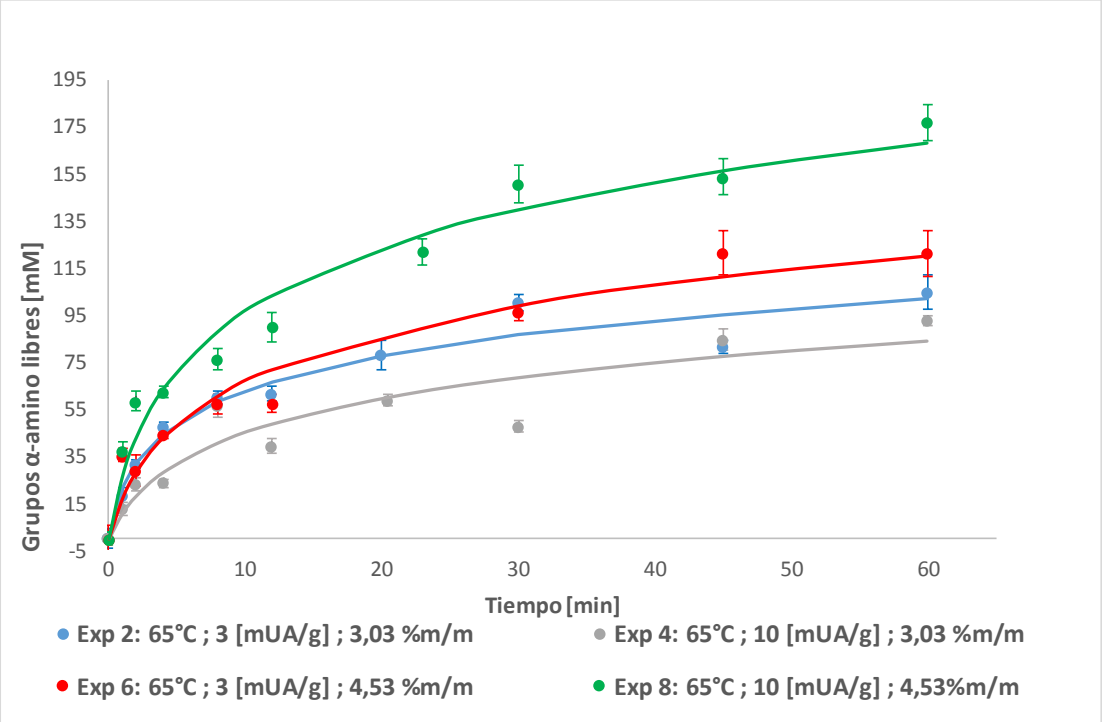

Figura 5.3. Curvas de hidrólisis de residuos de merluza con Alcalase donde se muestran los grupos alfa-amino en función del tiempo para los experimentos del diseño CCC. Los puntos corresponden a datos experimentales y las líneas al modelo ajustado.

Observando las Figura 5.2 y Figura 5.3 se observa que al aumentar la concentración inicial de proteína en todos los casos se traduce en una mayor formación de grupos α-aminos y extensión de la reacción, al existir más sustrato disponible para hidrolizar. En el caso de la concentración inicial de enzima en casi todos los casos aumenta la extensión y la formación de grupos α-aminos, con excepción de los experimentos 2 y 4 realizados a 65°C y 3,03%m/m.

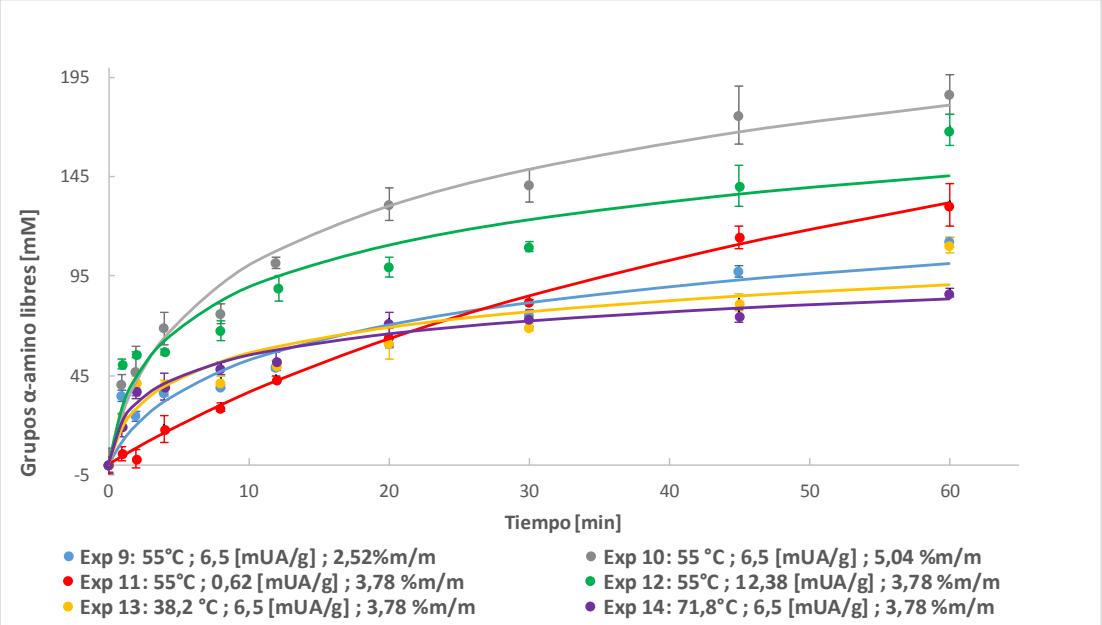

Figura 5.4. Curvas de hidrólisis de residuos de merluza con Alcalase donde se muestran los grupos alfa-amino en función del tiempo para los experimentos del diseño CCC. Los puntos corresponden a datos experimentales y las líneas al modelo ajustado. Los datos corresponden a los puntos estrella del diseño CCC.

La curva de hidrólisis del experimento 11, cuyas condiciones de operación son 55 °C, 0,62 [mUA/g] y 3,78 %m/m, posee un perfil diferente al resto de las curvas de hidrólisis en cuanto a la velocidad inicial de reacción. El valor de a' en el experimento 11 es de 4,31 [mM/min] y corresponde al valor más bajo de todos los experimentos. De hecho, este valor corresponde al 12% del valor promedio obtenido para a' en los experimentos centrales y a un 6% del valor más alto de a' obtenido en el experimento 7. Sin embargo, a pesar de baja velocidad inicial la hidrólisis en el experimento 11 alcanza valores comparables al del resto de los experimentos a los 60 minutos de reacción, obteniéndose una concentración de grupos aminos de 131[mM] considerando que se obtuvieron valores entre 87 y 188 [mM] en todos los experimentos. Este fenómeno observado en la curva de hidrólisis del experimento 11 resulta interesante debido a que, a pesar de la baja velocidad inicial, la reacción se extiende a valores de producto generado que es mayor que el obtenido en otras curvas de hidrólisis con velocidades iniciales mucho mayores que las de este experimento. Esto se podría explicar con el efecto de la modulación de la inactivación térmica de la enzima generado por la presencia de las proteínas del residuo, las cuales estabilizan la conformación nativa de la subtilisina (Valencia et al., 2014). En el experimento 11 la concentración de sustrato disminuye más lentamente que en las otras curvas de hidrólisis, tal como se observa en la Figura 5.4. Esto provocaría que la

enzima estuviese en contacto con una concentración de sustrato más alta por más tiempo en comparación con los otros experimentos, resultando en una estabilización más prolongada de la enzima, que se traduce en una concentración de grupos amino comparable a la del resto de los experimentos. Este resultado sugiere que la magnitud de la modulación es dependiente de la razón concentración de sustrato/concentración de enzima, lo cual está de acuerdo con reportes anteriores (Illanes, 2008).

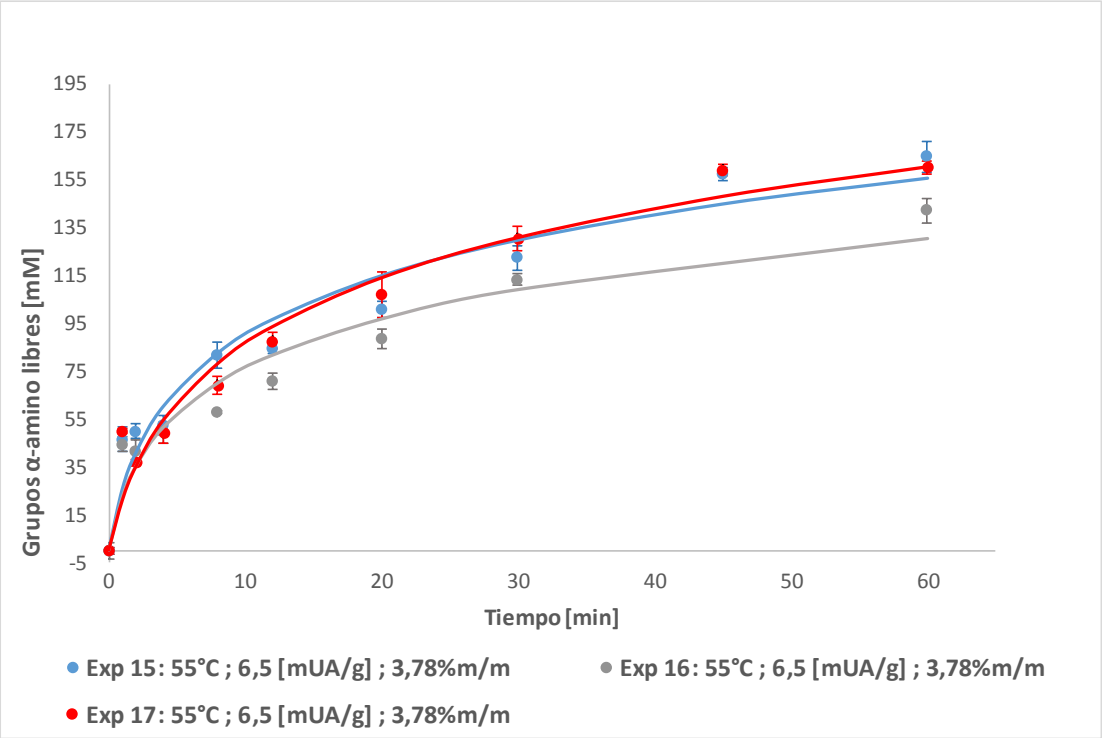

Figura 5.5. Curvas de hidrólisis de residuos de merluza con Alcalase donde se muestran los grupos alfa-amino en función del tiempo para los experimentos del diseño CCC. Los puntos corresponden a datos experimentales y las líneas al modelo ajustado. Los datos corresponden a réplicas centrales del diseño CCC.

De la Figura 5.5 que no existen diferencias considerables entre los experimentos realizados a las mismas condiciones de operación.

Para observar el efecto de la temperatura en las curvas de hidrólisis la Figura 5.6 muestra los ocho primeros experimentos del diseño CCC.

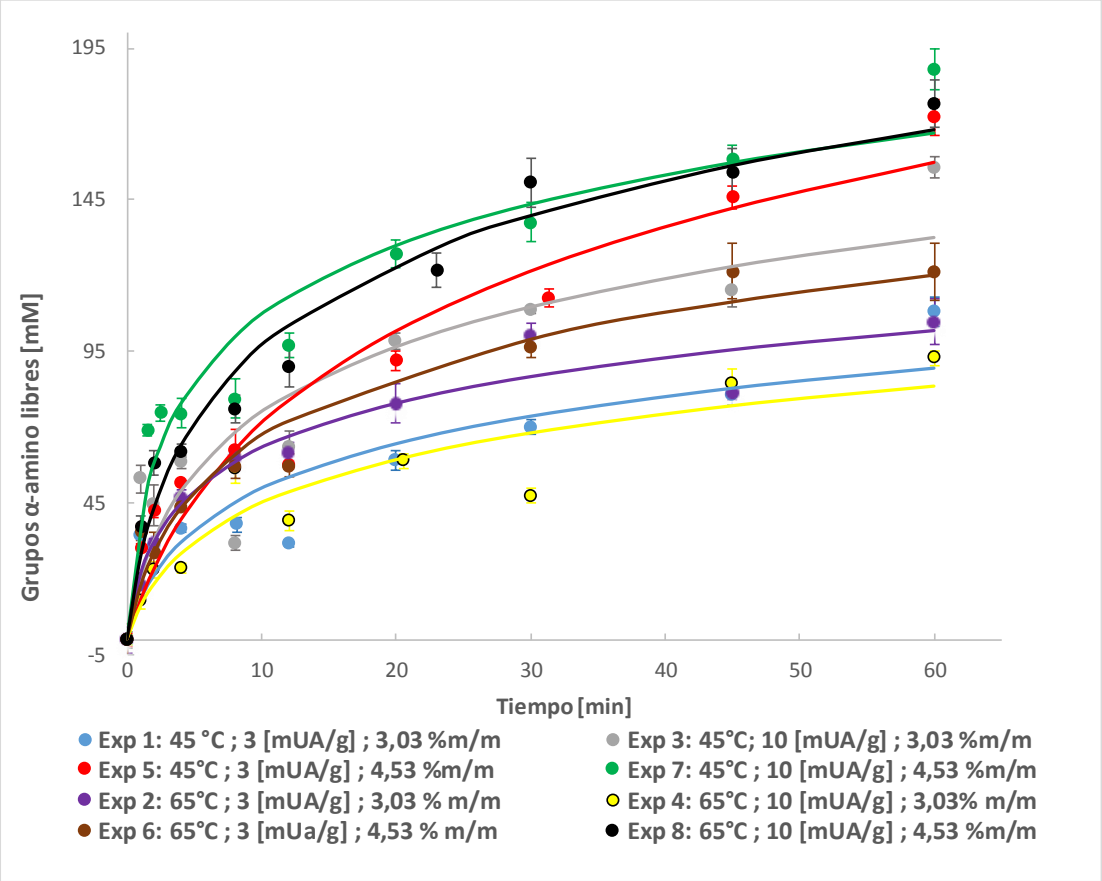

Figura 5.6 Curvas de hidrólisis de residuos de merluza con Alcalase donde se muestran los grupos alfa-amino en función del tiempo para los experimentos del diseño CCC. Los puntos corresponden a datos experimentales y las líneas al modelo ajustado.

No se puede determinar un patrón de comportamiento definido con respecto a la temperatura observando la Figura 5.6, se confirma lo anteriormente dicho con respecto a la concentración inicial de enzima y proteína respecto a las extensiones de las reacciones.

Los puntos experimentales de las diferentes curvas poseen el perfil característico de una reacción de hidrólisis enzimática de proteína en la cual destaca una fase inicial rápida, seguida de un decrecimiento progresivo de la velocidad de reacción (Kristinsson & Rasco, 2000); (Valencia et al., 2014).

Realizado el ajuste de los modelos se completa la primera etapa de modelamiento, y como resultado se obtienen 17 curvas modeladas según la ecuación de Qi & He. De los ajustes realizados además se calculó el coeficiente de determinación múltiple R^2, como indicador de la calidad del ajuste realizado. Se obtuvieron valores de R^2 de 0,814 hasta 0,997; de 17

experimentos, 14 de ellos con un R^2 sobre 0,9. Además se calculó el error estándar asociado a cada parámetro del modelo (Ecuación 4.22).

La Tabla 5.3 resume los resultados del primer nivel de modelamiento en donde se muestran los valores de los parámetros a' y b' para cada experimento y su error estándar respectivo.

Tabla 5.3. Valores de a', b' y R^2 para los ajustes de la ecuación logarítmica a las curvas de hidrólisis del diseño *CCC*.

EXP	T	E	S	a'	b'	R^2	error estándar +-	
	[°C]	[mUA/g]	% [m/m]	[mM/min]	[mM^{-1}]		a'	b'
1	45	3	3,03	16,8	0,0422	0,823	10,35	0,0128
2	65	3	3,03	35,5	0,0449	0,959	11,76	0,0058
3	45	10	3,03	27,1	0,0294	0,814	17,41	0,0090
4	65	10	3,03	13,8	0,0429	0,884	6,95	0,0114
5	45	3	4,53	14,2	0,0176	0,932	4,62	0,0041
6	65	3	4,53	23,0	0,0315	0,953	7,49	0,0050
7	45	10	4,53	74,0	0,0291	0,936	31,08	0,0045
8	65	10	4,53	37,5	0,0237	0,968	9,93	0,0029
9	55	6,5	2,52	14,2	0,0332	0,909	5,70	0,0076
10	55	6,5	5,04	33,3	0,0206	0,979	6,75	0,0021
11	55	0,62	3,78	4,3	0,0092	0,997	0,25	0,0010
12	55	12,38	3,78	47,1	0,0308	0,919	21,33	0,0056
13	38,2	6,5	3,78	30,7	0,0502	0,890	16,65	0,0108
14	71,8	6,5	3,78	46,2	0,0614	0,978	12,11	0,0056
15	55	6,5	3,78	36,34	0,0261	0,950	12,00	0,0039
16	55	6,5	3,78	32,3	0,0317	0,905	12,10	0,0060
17	55	6,5	3,78	26,7	0,0225	0,956	7,76	0,0034

En la Tabla 5.3 se puede observar que el parámetro a' aumenta en la mayoría de los casos cuando la concentración inicial de enzima es mayor. Respecto a la temperatura y a la concentración de proteína no se aprecia un patrón de comportamiento definido. Para el parámetro b', se observa una leve tendencia a disminuir cuando se aumenta la concentración de proteína, mientras que no se observa un patrón definido respecto a la temperatura y concentración inicial de enzima.

Se aprecia además que el error estándar asociado a los parámetros es alto, pero en ningún caso es mayor que el valor del parámetro.

5.1.2 Segundo nivel de modelamiento

El segundo nivel de modelamiento contempla la utilización de MSR para la obtención de dos modelos de respuesta, uno para el parámetro a' y el otro para b', en función de los factores T, E y S.

Estos modelos se obtuvieron mediante una regresión lineal multivariable realizada en base a la ecuación 4.12 a partir de los valores de los parámetros a' y b' que se muestran en la Tabla 5.3 que ahora son las variables dependientes, más las condiciones de operación en unidades codificadas.

Se obtuvieron los valores de los coeficientes β_i ; β_{ii} y β_{ij} para cada modelo y se realizó el algoritmo presentado en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** en la cual se r ealiza la prueba de significancia de los parámetros, en donde se calcula el valor de $|t_0|$ mediante la ecuación 4.26, para luego ser contrastado con el estadígrafo *t-student* según:

$$|t_0| > t_{\frac{\alpha}{2};(n-k-1)} \tag{5.1}$$

Los resultados de los coeficientes de la regresión se muestran en las Tabla 5.4 y Tabla 5.5.

Tabla 5.4. Coeficientes de la MSR para el parámetro a'

	Primera regresión $t(0,025;7) = 2,365$		**Segunda Regresión** $t(0,025;12) = 2,179$		**Tercera Regresión** $t(0,025;13) = 2,160$	
Predictor para a'	Coeficiente β_i	$\|t0\|$	Coeficiente β_i	$\|t0\|$	Coeficiente β_i	$\|t0\|$
Constante	31,7	7,9	30,2	10,6	30,2	12,4
T	0,3	0,1				
E	9,9	5,2	9,9	3,1	9,9	3,6
S	6,4	3,4	6,4	2,0		
TS	-4,1	1,7				
TE	-9,7	3,9	-9,7	2,3	-9,7	2,7
ES	10,7	4,4	10,7	2,6	10,7	3,0
T^2	2,6	1,3				
E^2	-1,9	0,9				
S^2	-2,6	1,3				

Tabla 5.5. Coeficientes de la MSR para el parámetro b'.

	Primera regresión $t(0,025;7) = 2,365$		**Segunda Regresión** $t(0,025;14) = 2,145$	
Predictor para b'	Coeficiente β_i	$\|t0\|$	Coeficiente β_i	$\|t0\|$
Constante	0,0269	6,1131	0,0237	9,8350
T	0,0032	1,5478		
E	0,0018	0,8898		
S	-0,0058	2,7818	-0,0058	2,9054
TS	-0,0010	0,3595		
TE	-0,0011	0,3917		
ES	0,0023	0,8623		
T^2	0,0098	4,3123	0,0106	5,2049
E^2	-0,0029	1,2567		
S^2	-0,0004	0,1755		

Prueba de significancia de la regresión

Para cada parámetro se muestra el análisis de varianza para la regresión en las Tabla 5.6 y Tabla 5.7.

Tabla 5.6. Análisis de varianza y coeficiente de determinación múltiple de la regresión de a'.

Fuente	Suma Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F0	F
regresión	5609,5	3	1869,8	18,6	4,34717
error	1305,9	13	100,5		
Total	4303,6	16			
R^2	0,696				
R^2ajustado	0,626				

Tabla 5.7. Análisis de varianza y coeficiente de determinación múltiple de la regresión de b'

Fuente	Suma Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F0	F
Regresión	0,0034	2	0,0017	31,7658	4,8567
Error	0,0007	14	0,00001		
Total	0,0027	16			
R^2	0,717				
R^2ajustado	0,676				

Para ambos casos se rechaza la hipótesis nula H_0: $\beta_i = 0$, es decir que para ambas regresiones existe por lo menos un parámetro que aporte al modelo significativamente. Esto se concluye debido a que $F_0 > F_{\left(\frac{\alpha}{2};k;n-k-1\right)}$. Sin embargo, para ambas respuestas se observa que el ajuste no es tan preciso debido a que tanto en R^2 como en R^2_{ajustado} se obtienen valores cercanos a 0,7.

Resultados de la regresión

Finalmente se tiene que las variables significativas sobre la respuesta de a' son la concentración inicial de enzima, más los efectos combinados de temperatura con concentración inicial de enzima y temperatura con concentración inicial de proteína.

El modelo para variables codificadas se expresa entonces como:

$$y_{a'} = 30{,}2 + 9{,}9 \cdot x_2 - 9{,}7 \cdot x_1 x_2 + 10{,}7 \cdot x_1 x_3 \qquad (5.2)$$

Este modelo queda gráficamente representado por la Figura 5.7 hasta la Figura 5.12.

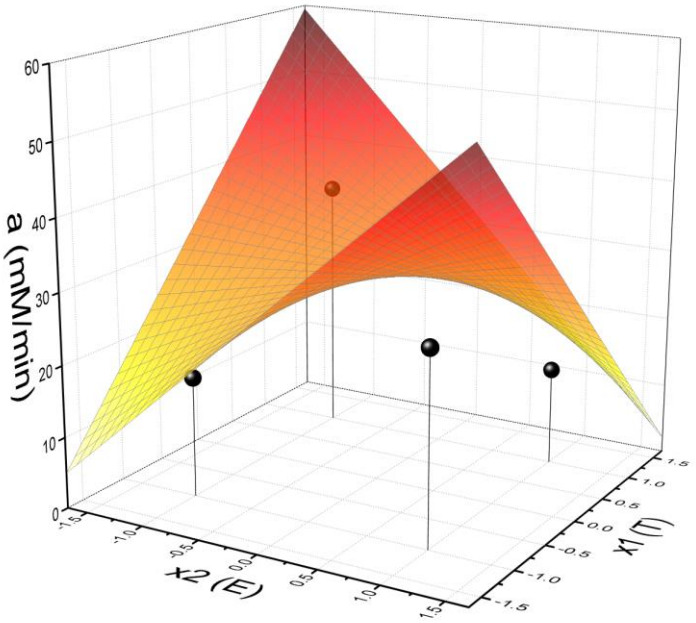

Figura 5.7. Superficie de Respuesta para a' en función de E y T para S=-1.

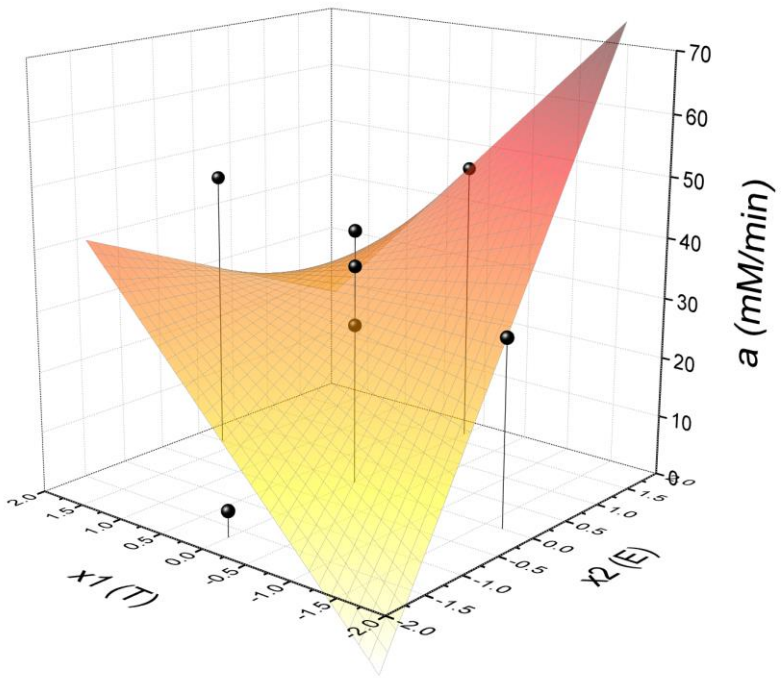

Figura 5.8. Superficie de Respuesta para a' en función de E y T para S=0.

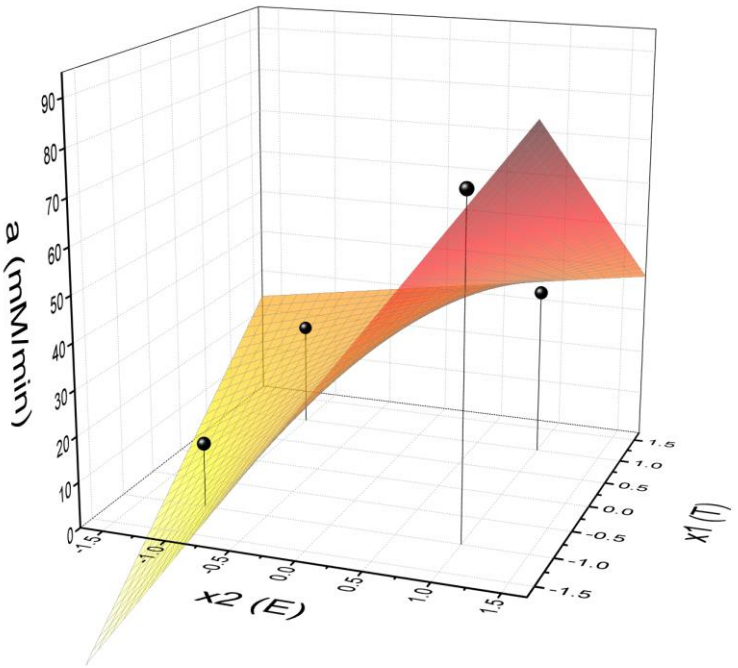

Figura 5.9. Superficie de Respuesta para a' en función de E y T para S=1.

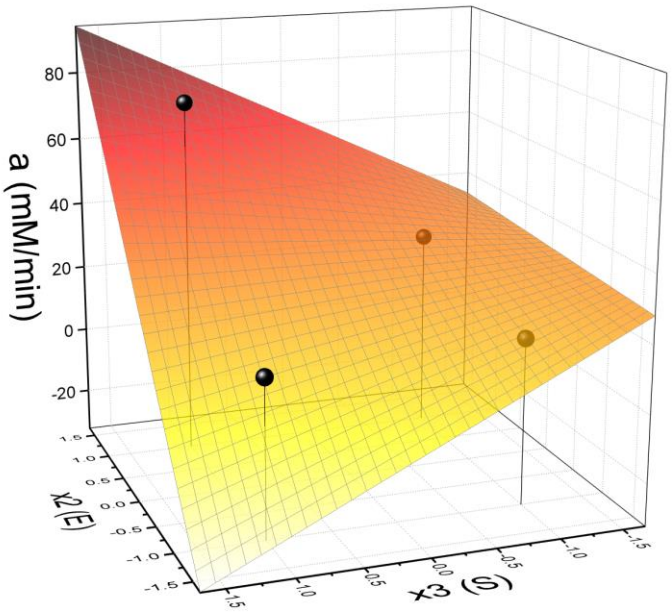

Figura 5.10. Superficie de Respuesta para a' en función de E y S para T=-1.

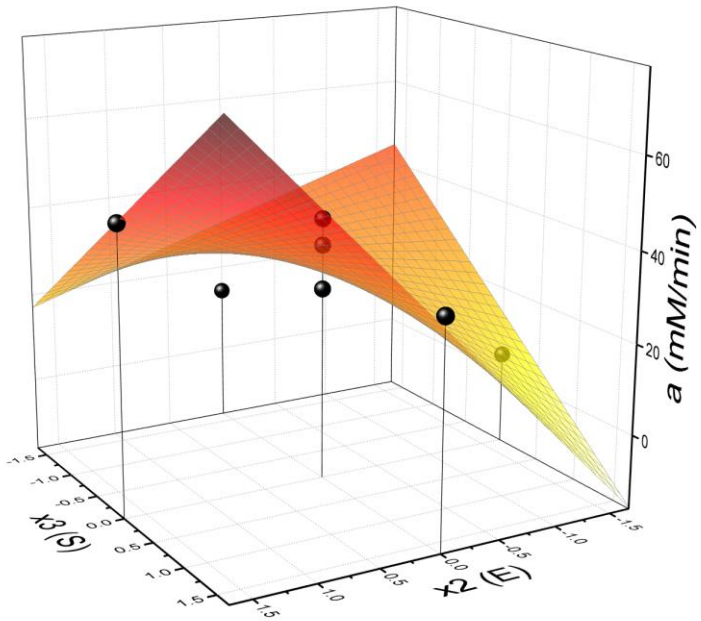

Figura 5.11. Superficie de Respuesta para a' en función de E y S para T=0.

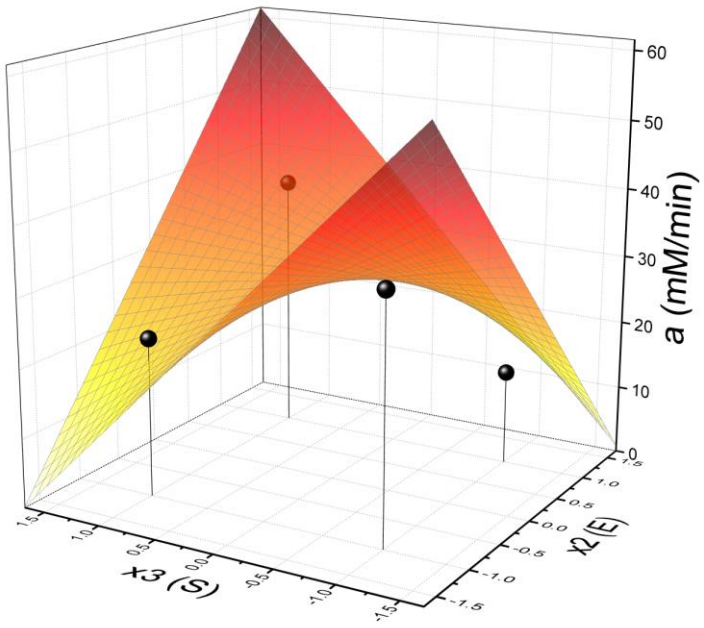

Figura 5.12. Superficie de Respuesta para a' en función de E y S para T=1.

Análogamente para b’ se obtuvo que las variables significativas, son la concentración de proteína y el efecto cuadrático de la temperatura. El modelo ajustado para predecir la respuesta de b’ se expresa como:

$$y_{b'} = 0{,}0237 - 0{,}0058 \cdot x_3 + 0{,}0106 \cdot {x_1}^2 \qquad (5.3)$$

Este modelo se ve gráficamente representado por la Figura 5.13.

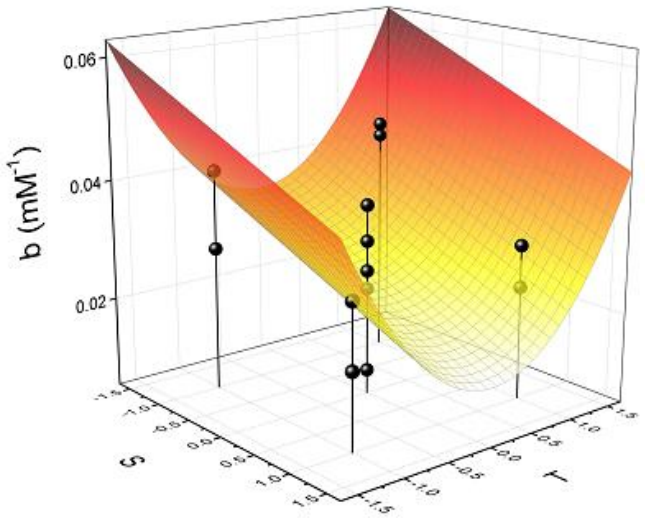

Figura 5.13. Superficie de Respuesta para b' en función de S y T.

En base a los resultados obtenidos en el modelo, se puede observar, que para la zona analizada mediante MSR, la superficie de respuesta asociada a la variable a' tiene la forma de una silla de montar en todos los gráficos, lo cual significa que aumentar algún factor del diseño, el cambio obtenido sobre la respuesta de a' dependerá del efecto de la interacción con los otros factores.

Para la superficie de respuesta asociada a la variable b' se puede apreciar claramente que este parámetro disminuye al aumentar la concentración inicial de proteína, pero se ve un efecto parabólico al moverse entre el rango de temperatura de la zona de estudio, en donde entre 45 y 65°C se obtienen los valores más bajos del parámetro b'.

El parámetro a' no concuerda del todo con lo reportado por Qi & He, (2006) donde señalan que el parámetro a' disminuye al aumentar S. Para el modelo de predicción obtenido el efecto lineal de S no resulta significativo y concuerda con lo reportado por Valencia et al., (2015) donde la razón principal es la concentración de sustrato a la cual se trabajó, ubicada sobre la zona de saturación en la gráfica de velocidad inicial versus S, donde la velocidad inicial no varía significativamente cuando se utiliza sobre un 1 %[w/w] de proteína. Por otra parte, al aumentar E se esperaría un aumento de a' independiente de T, debido a que existen más agentes catalizadores y por lo tanto una velocidad inicial de reacción mayor. En este caso, en las gráficas de superficie de respuesta se puede constatar que el efecto de E no concuerda

con lo planteado ni con los reportes anteriores (Valencia et al., 2015); (Qi & He, 2006). Esta falta de concordancia se puede explicar por factores como el tipo de sustrato y el método de inactivación utilizado. Qi & He, (2006) en su reporte utilizan Albumina de Suero Bovino (BSA por sus siglas en inglés) el cual se caracteriza por ser casi en un 100% proteína, en cambio, para el residuo de merluza sólo el 5,04% del peso corresponde a proteína, lo que puede afectar directamente la reología del sistema, ya que para lograr una concentración inicial de proteína elevada se necesita una mayor concentración de sólidos, lo que puede traducirse en que el sistema carezca de mezclamiento perfecto sobre todo al inicio de la reacción, afectando así la homogeneidad de las muestras tomadas en los primeros minutos de la reacción. Otro factor que pudo ser clave en la respuesta del parámetro a' es el método de inactivación utilizado posteriormente al muestreo, en el cual se contempló la inactivación térmica por 15 minutos a 85°C, el cual no detiene la reacción de hidrólisis instantáneamente, sino que las enzimas siguen hidrolizando mientras se inactivan. Esto se traduce en una mayor concentración de grupos α-aminos de los que realmente habían sido generados al momento de tomar la muestra.

Para el caso del parámetro b' el rango de temperatura estudiado por Qi & He, (2006) fue de 35 hasta 55°C en donde concluyen que incremento de la temperatura provoca una disminución del parámetro b'. En el presente estudio el rango de temperatura fue de 38 a 72°C, donde se observa un efecto cuadrático de la temperatura que genera un rango optimo que va desde los 45 a 65°C obteniendo la mejor respuesta a los 55°C, donde los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Qi & He, (2006) para el rango de temperatura estudiado. El efecto observado del parámetro b' con la temperatura desde los 38°C hasta los 55°C se debe a que, al ir aumentando la temperatura, la eficiencia catalítica de la enzima aumentará hasta llegar a su máximo generando una mayor extensión de la reacción y una disminución en el valor de b'. Sobre los 55°C los efectos de inactivación de la enzima se hacen más significativos generando una disminución de la extensión y por consiguiente un aumento del parámetro b'. En base a esto se puede inferir que el parámetro b' es el reflejo de la actividad de la enzima en función de la temperatura.

Verificación de la adecuación del modelo

Se analizaron los residuos de los ajustes de MSR en donde se obtuvo que, según las Figura 5.14 y Figura 5.16, los residuos siguen una distribución normal para ambos modelos. Adicionalmente se puede observar en las Figura 5.15 y Figura 5.17 que los residuos se encuentran distribuidos de manera aleatoria y no dependen del valor ajustado del modelo. Con estos gráficos se concluye que se cumplen los supuestos de los modelos planteados.

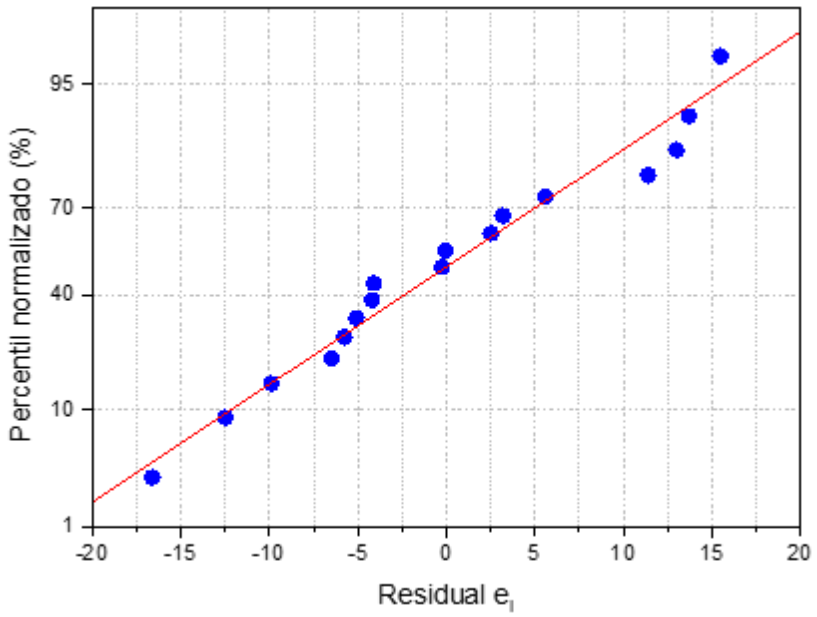

Figura 5.14. Gráfica de probabilidad normal los residuos del modelo de respuesta de a'.

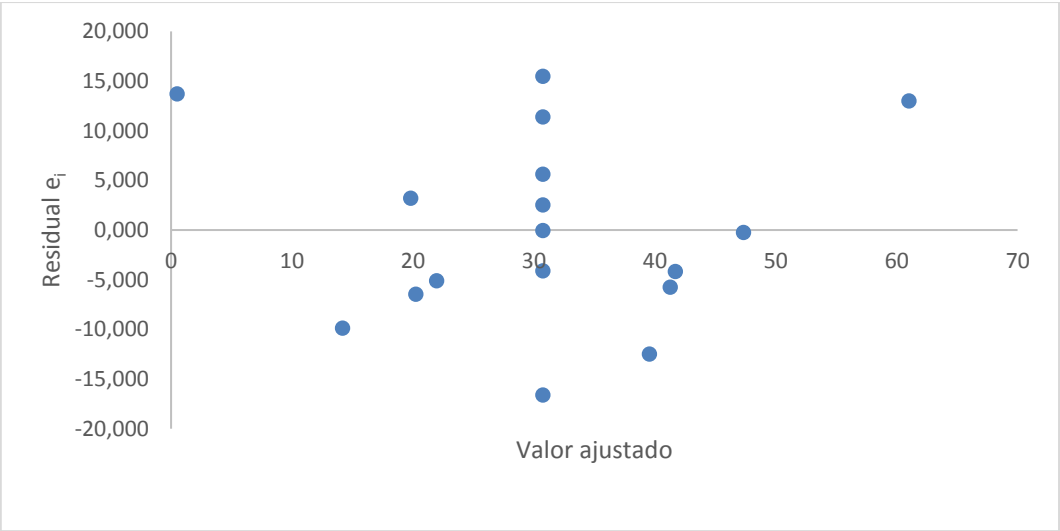

Figura 5.15. Gráfica de residuales vs valores ajustados $\hat{y}_i$ para el parámetro a'.

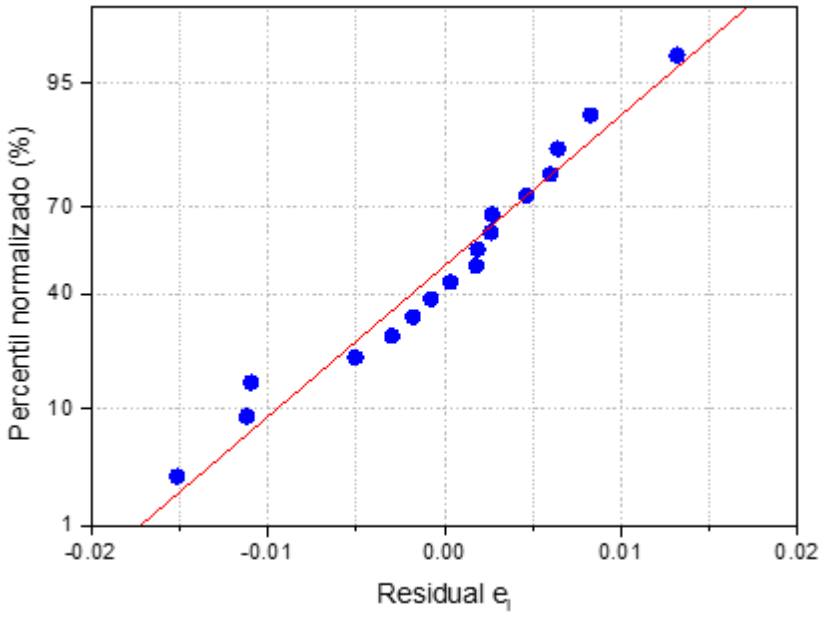

Figura 5.16. Gráfica de probabilidad normal los residuos del modelo de respuesta de b'.

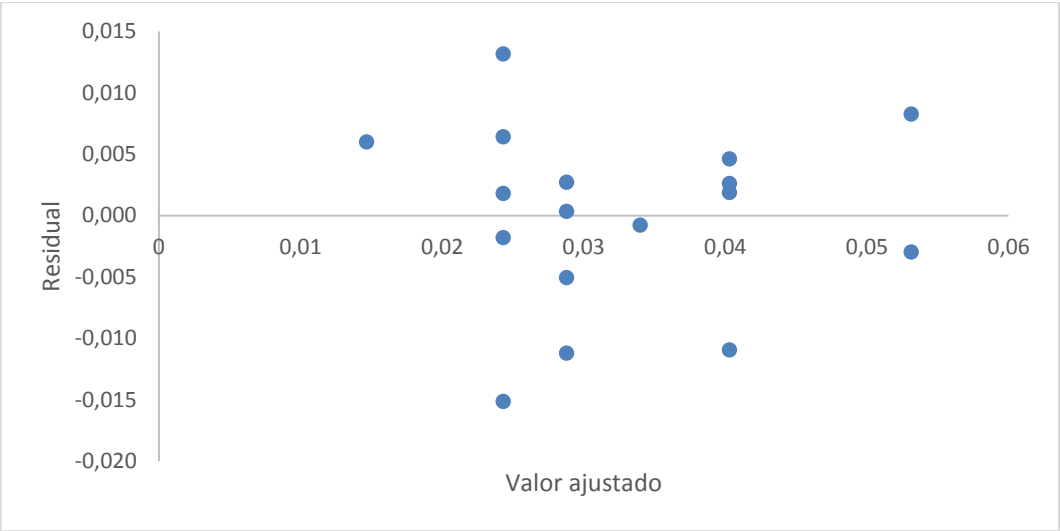

Figura 5.17. Gráfica de residuales vs valores ajustados $\hat{y}_i$ para el parámetro b'.

Valores de predicción de los modelos

Se calcularon los valores predichos por el modelo y se contrastaron con los datos obtenidos experimentalmente, la Tabla 5.8 que resume los parámetros obtenidos de forma experimental en contraste con los valores predichos por los modelos ajustados.

Tabla 5.8. Parámetros del modelo logarítmico experimental y modelo ajustado.

	Condiciones de Operación			**Experimental y_i**		**Modelo $\hat{y}_i$**	
Medición	T	E	S	a'	b'	a'	b'
	[°C]	[mUA/g]	% [m/m]	[mM/min]	[mM-1]	[mM/min]	[mM-1]
1	45	3	3,03	16,9	0,0422	21,4	0,0400
2	65	3	3,03	35,5	0,0449	40,7	0,0400
3	45	10	3,03	27,1	0,0294	39,0	0,0400
4	65	10	3,03	13,8	0,0429	19,7	0,0400
5	45	3	4,53	14,2	0,0176	-0,1	0,0285
6	65	3	4,53	23,0	0,0315	19,2	0,0285
7	45	10	4,53	74,0	0,0291	60,5	0,0285
8	65	10	4,53	37,5	0,0237	41,1	0,0285
9	55	6,5	2,52	14,2	0,0332	30,2	0,0334
10	55	6,5	5,04	33,3	0,0206	30,2	0,0140
11	55	0,62	3,78	4,3	0,0092	13,6	0,0237
12	55	12,38	3,78	47,1	0,0308	46,8	0,0237
13	38,2	6,5	3,78	30,7	0,0502	30,2	0,0535
14	71,8	6,5	3,78	46,2	0,0614	30,2	0,0535
15	55	6,5	3,78	36,4	0,0261	30,2	0,037
16	55	6,5	3,78	32,3	0,0375	30,2	0,0237
17	55	6,5	3,78	26,7	0,0225	30,2	0,0237

Se observa que el valor predicho se aleja en algunos casos del valor experimental obtenido. Para visualizar esta comparación se presentan las gráficas de correlación entre los valores predichos y experimentales para los parámetros a' y b' del modelo logarítmico.

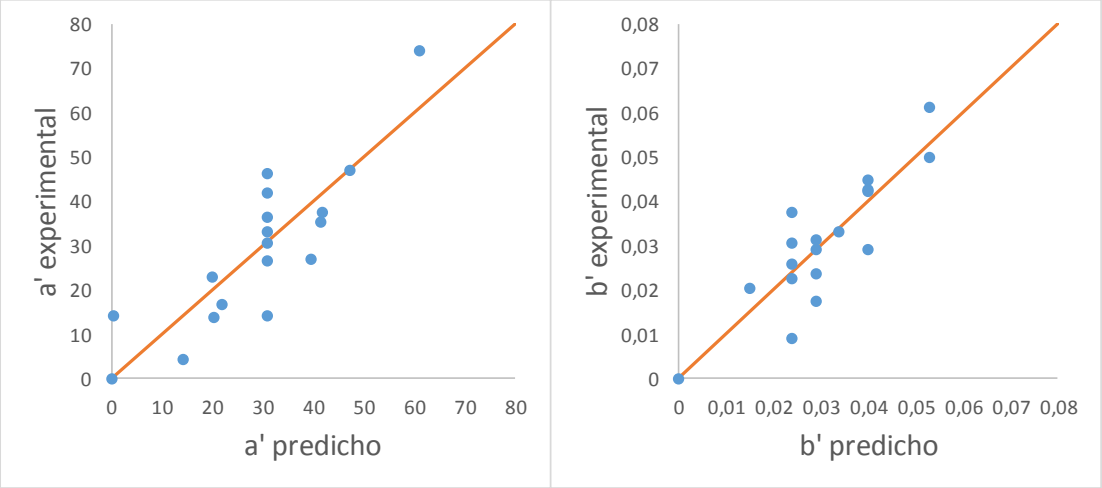

Figura 5.18. Correlación entre b' experimental y b' predicho.

Se observa de las gráficas de correlación, que existen datos predichos que se alejan de lo experimental, como por ejemplo en el experimento 5, el valor experimental de a' es de $y_i = 14{,}21$ y el modelo predice un valor de $\hat{y}_i = 0{,}50$. O en el caso de b' para el experimento 11 el valor experimental es de $y_i = 0{,}0092$ y el valor del modelo entrega un valor de $\hat{y}_i = 0{,}024$.

A partir del análisis de las gráficas de correlación en el ítem 5.1.2 y la

Tabla 5.8 se determina que el modelo, no resulta del todo confiable para predecir las respuestas.

5.2 Extracción de Nitrógeno.

Fracción soluble

Para poder determinar el porcentaje de extracción de nitrógeno alcanzado en cada experimento, se cuantificó la fracción soluble obtenida a partir de la razón entre la masa de sobrenadante medido en la muestra a los 60 minutos de reacción y la masa de la mezcla de reacción. Los resultados de las fracciones solubles obtenidas en cada experimento se muestran en la Tabla 5.9.

Tabla 5.9. Fracción soluble después de 60 minutos de hidrólisis.

	T	E	S	Fracción
Experimento	[°C]	[mUA/g]	% w/w	**Soluble**
1	45	3	3,03	0,60
2	65	3	3,03	0,51
3	45	10	3,03	0,61
4	65	10	3,03	0,52
5	45	3	4,53	0,32
6	65	3	4,53	0,33
7	45	10	4,53	0,40
8	65	10	4,53	0,37
9	55	6,5	2,52	0,65
10	55	6,5	5,04	0,20
11	55	0,62	3,78	0,40
12	55	12,38	3,78	0,49
13	38,2	6,5	3,78	0,47
14	71,8	6,5	3,78	0,39
15	55	6,5	3,78	0,48
16	55	6,5	3,78	0,47
17	55	6,5	3,78	0,44

Se observó que la fracción soluble se correlaciona de manera inversa con la concentración inicial de proteína utilizada en cada experimento. Esto se explica netamente por la proporción Residuo-Agua utilizada para lograr la concentración inicial de proteína deseada. Al utilizar una concentración mayor de proteína se agrega menos agua lo que repercute directamente en la fracción soluble final observada como muestra la Figura 5.19.

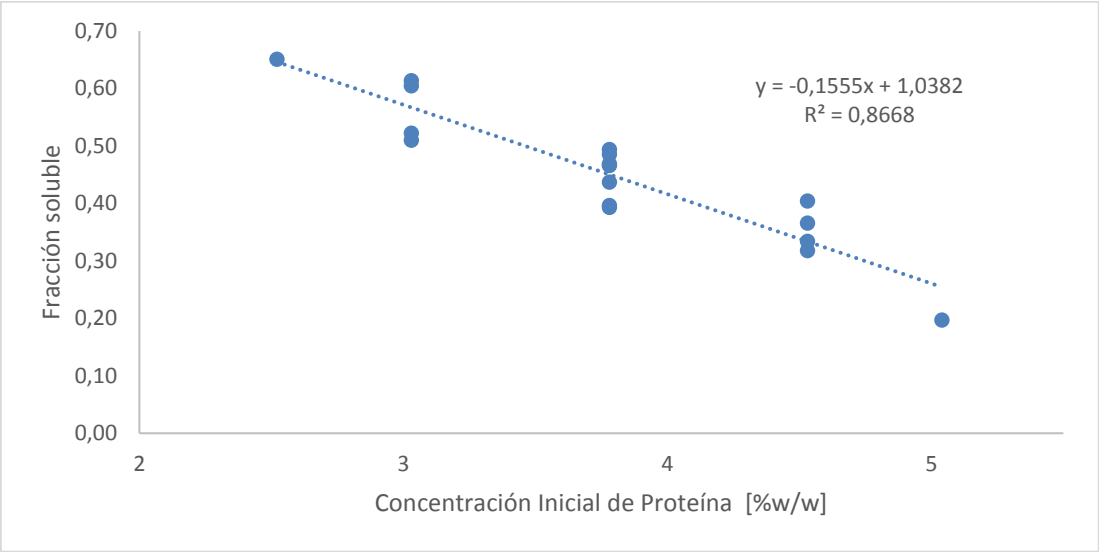

Figura 5.19. Correlación entre fracción soluble obtenida después de 60 minutos de reacción y concentración inicial de proteína utilizada.

Porcentaje de Extracción de Nitrógeno

En cada experimento se determinó la concentración de nitrógeno total presente en el sobrenadante de las muestras tomadas a los 60 minutos de reacción. La Tabla 5.10 muestra la extracción de nitrógeno alcanzada para cada tratamiento, además, para efecto de contraste de muestra el grado de hidrólisis final.

Tabla 5.10. Extracción de nitrógeno y grado de hidrólisis alcanzada después de 60 minutos de reacción para cada tratamiento.

Experimento	T [°C]	E [mUA/g]	S % w/w	Extracción Nitrógeno [%]	%DH
1	45	3	3,03	110,9	25,1
2	65	3	3,03	91,3	20,5
3	45	10	3,03	133,0	36,6
4	65	10	3,03	88,2	18,6
5	45	3	4,53	58,4	14,0
6	65	3	4,53	63,9	10,4
7	45	10	4,53	78,6	19,5
8	65	10	4,53	79,0	16,6
9	55	6,5	2,52	128,0	33,6
10	55	6,5	5,04	38,2	8,4
11	55	0,62	3,78	73,2	15,9
12	55	12,38	3,78	97,1	25,6
13	38,2	6,5	3,78	81,3	16,0
14	71,8	6,5	3,78	74,3	10,5
15	55	6,5	3,78	100,3	24,6
16	55	6,5	3,78	89,9	20,4
17	55	6,5	3,78	79,52	21,5

El porcentaje de extracción de nitrógeno se correlacionó con las variables de operación E, T y S mediante la MSR para determinar que variables lo afectan significativamente.

Para el rango en el que se realizó el estudio, los efectos significativos fueron los asociados a la concentración inicial de enzima, concentración inicial de sustrato y el efecto de la interacción entre la temperatura y la concentración inicial de proteína. La ecuación que modela la respuesta del porcentaje de extracción de nitrógeno es:

$$y_{\%N} = 86{,}2 + 6{,}9 \cdot x_2 - 21{,}6 \cdot x_3 + 8{,}8 \cdot x_1 x_3 \qquad (5.4)$$

El análisis de varianza de la regresión se muestra en la Tabla 5.11, donde se determinó que existe al menos un parámetro que aporta al modelo significativamente. En términos de calidad de ajuste el valor obtenido para el coeficiente de determinación R^2 es de 0,85.

Tabla 5.11. Análisis de varianza y coeficiente de determinación múltiple de la regresión de porcentaje de extracción de nitrógeno

Fuente	Suma Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F0	F
Regresión	10313,1	3	3437,7	33,2	4,347
Error	1346,8	13	103,6		
Total	8966,3	16			
R^2	0,850				
R^2ajustado	0,815				

El modelo que representa la respuesta del porcentaje de extracción de nitrógeno se presenta en las figuras Figura 5.20 hasta Figura 5.28.

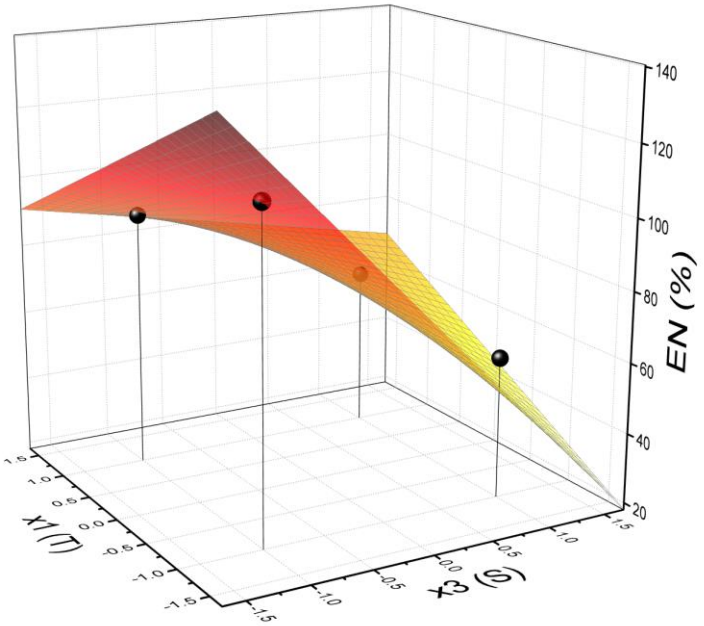

Figura 5.20. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de S y T para E=-1.

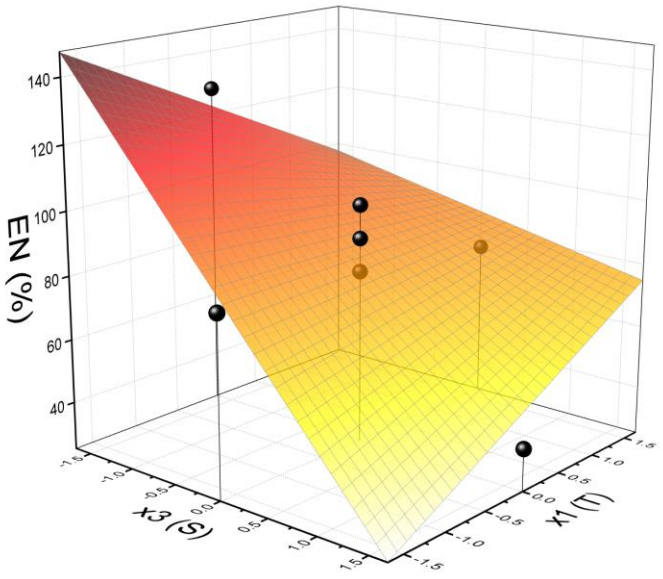

Figura 5.21. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de S y T para E=0.

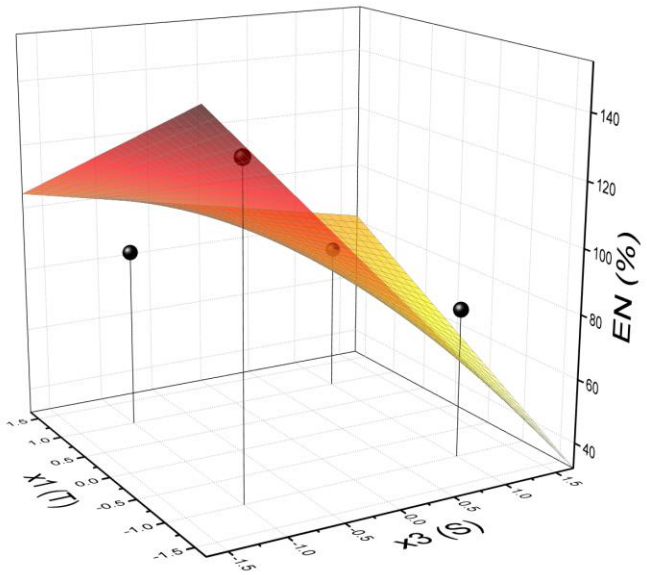

Figura 5.22. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de S y T para E=1.

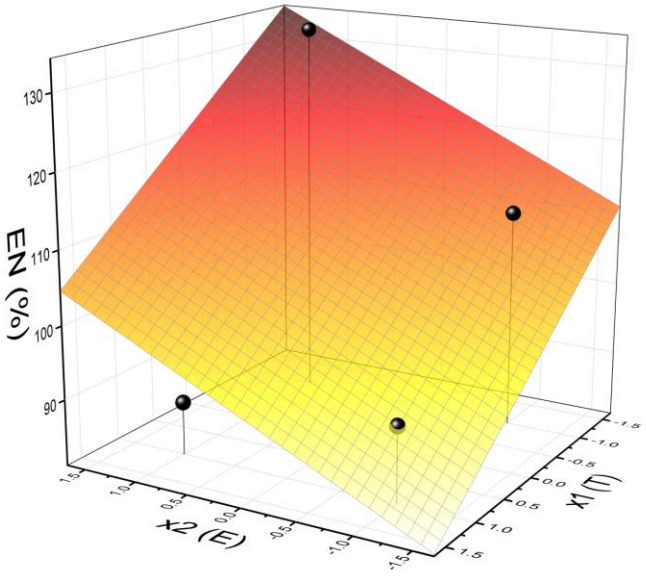

Figura 5.23. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de E y T para S=-1.

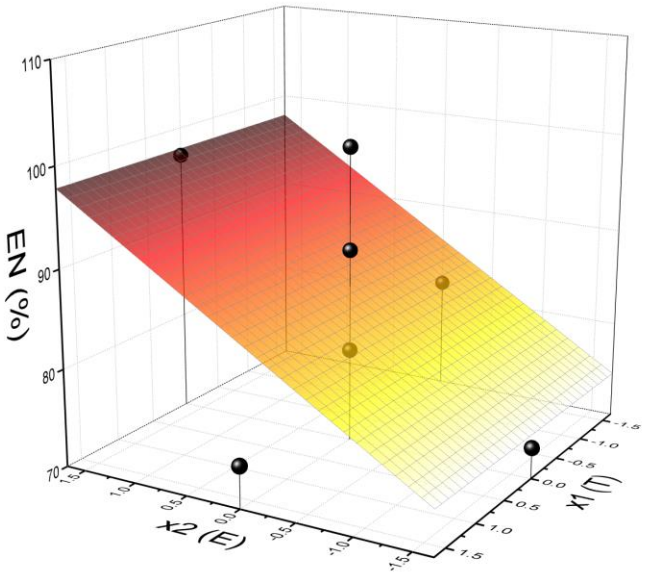

Figura 5.24. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de E y T para S=0.

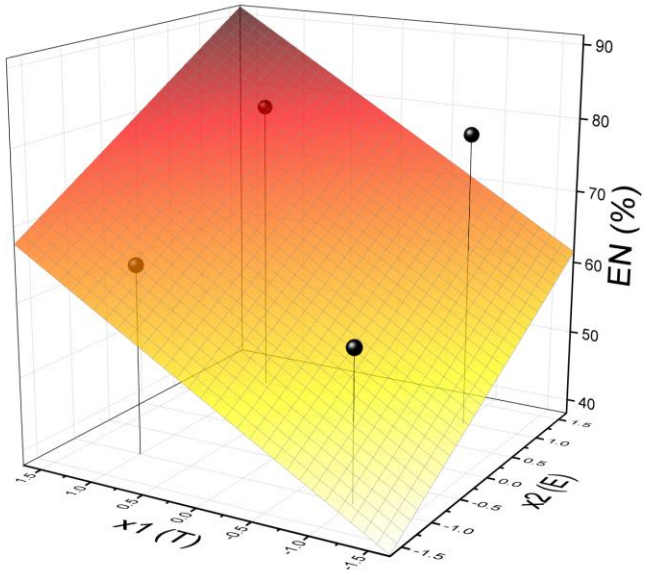

Figura 5.25. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de E y T para S=1.

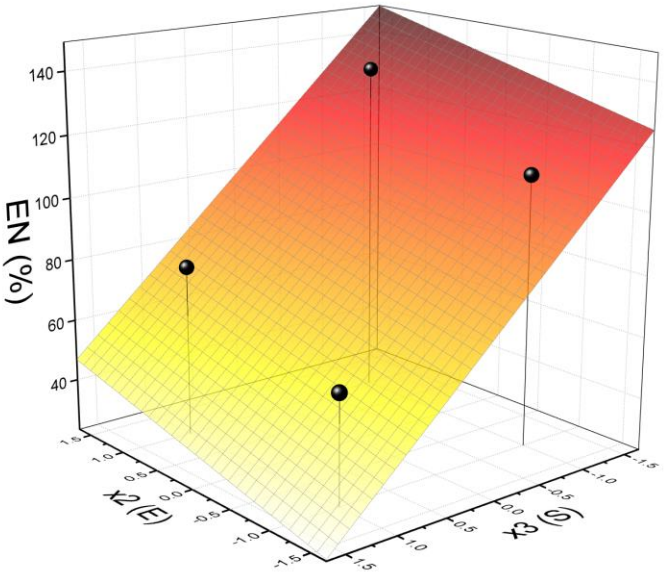

Figura 5.26. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de E y S para T=-1.

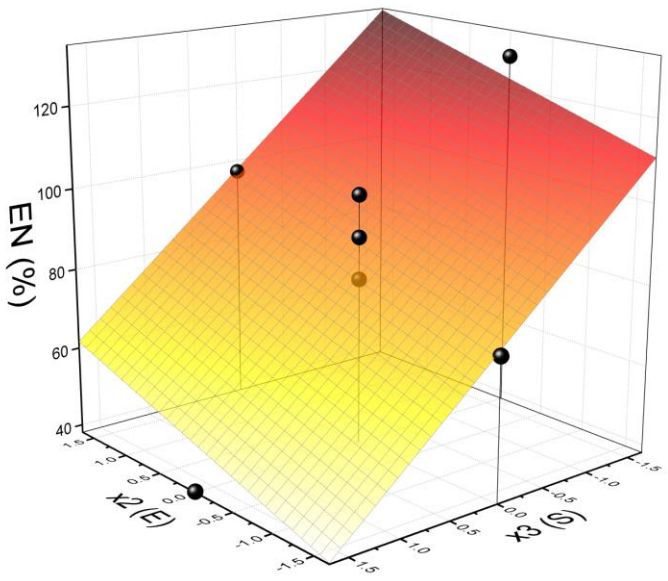

Figura 5.27. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de E y S para T=0.

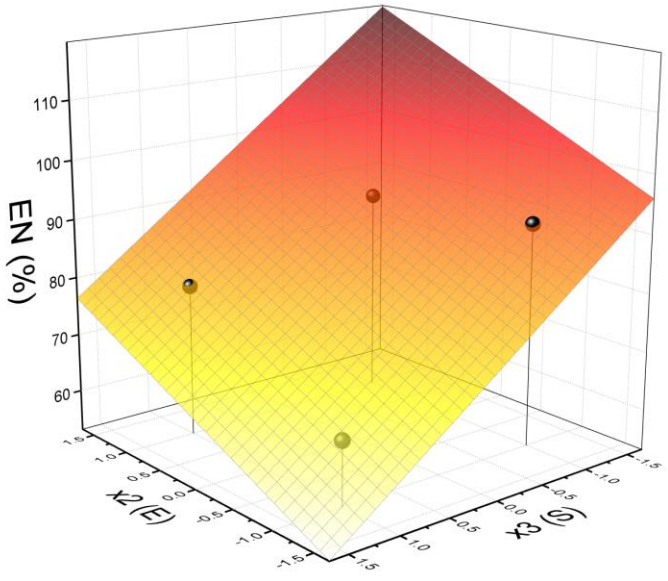

Figura 5.28. Superficie de Respuesta para EN (%) en función de E y S para T=1.

Analizando la gráfica de superficie de respuesta, se observa que el porcentaje de extracción de nitrógeno aumenta, cuando la concentración inicial de enzima es mayor, y disminuye drásticamente cuando la concentración inicial de proteína es mayor. Existe además un efecto combinado entre la temperatura y la concentración inicial de proteína del cual se puede interpretar que el mayor porcentaje de extracción de nitrógeno se puede obtener trabajando a una temperatura entre los 38-55°C y a baja concentración de proteína. El factor que más repercute en el porcentaje de extracción de nitrógeno es la concentración de proteína utilizada.

Tanto el grado de hidrólisis como la extracción de nitrógeno son indicadores del rendimiento de la reacción de hidrólisis. Cuando se incrementa la concentración de proteína se aumenta la cantidad de sustrato disponible, y como se mencionó anteriormente, cuando se aumenta la concentración de sustrato en un valor superior al 1 % [w/w] la velocidad inicial de reacción no posee cambios significativos (Valencia et al., 2014). Esto repercute de manera directa en el grado de hidrólisis y en la extracción de nitrógeno ya que, al usar concentraciones mayores de sustrato, la velocidad de la reacción se mantiene, pero se cuenta con mucho más sustrato disponible, por lo que el producto generado corresponde a una proporción menor respecto a la concentración de proteína inicial. Asimismo, la concentración de enzima también resulta significativa ya que, al aumentar la cantidad de enzima, aumenta la cantidad de sitios activos disponibles para catalizar la reacción de hidrólisis, lo que se traduce en un aumento en la generación de grupos aminos. Finalmente, para el efecto de la interacción entre la temperatura y concentración inicial de proteína, se observa que al aumentar la temperatura aun cuando se tiene una concentración inicial de proteína alta, ésta permite una mayor formación de producto debido a que la temperatura aumenta el estado de agitación de las moléculas favoreciendo la reacción de hidrólisis.

5.1 Comparación de tratamientos de pH

Se determinó el efecto de la hidrólisis enzimática de proteínas sin control de pH comparando curvas de hidrólisis a pH controlado en 8, a pH inicial 8 y sin control y finalmente a pH inicial nativo y sin control. La Figura 5.29 muestra las curvas de hidrólisis para las condiciones de operación señaladas en el ítem 4.5. Además, se registró el pH en función del tiempo, para los tres tratamientos, para observar cómo se produce el cambio en el pH en los tres casos, la Figura 5.30 muestra los resultados obtenidos para los experimentos y sus réplicas.

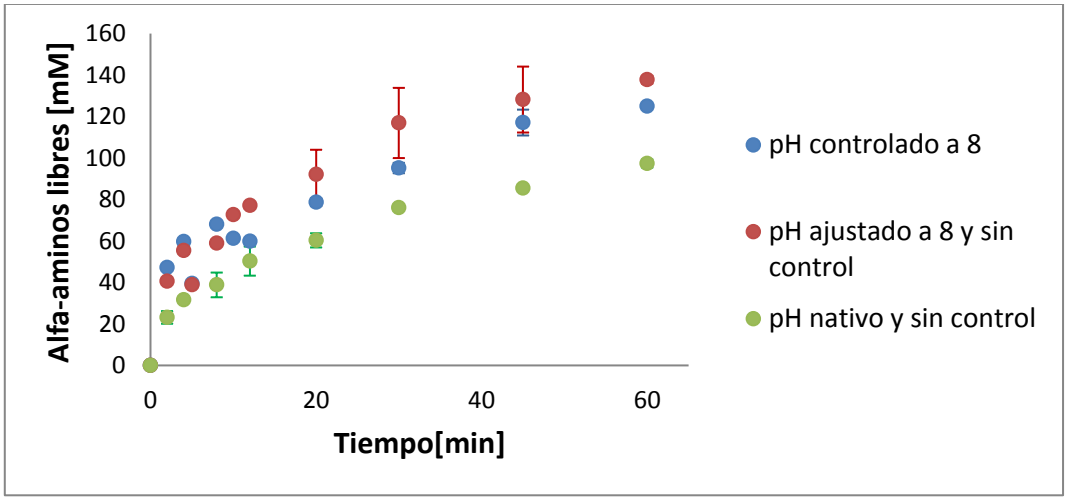

Figura 5.29. Curvas de hidrólisis de residuos de merluza con Alcalase donde se muestran los grupos alfa-amino en función del tiempo para los experimentos bajo distintas condiciones de pH. Los tres experimentos se realizaron a E=6,5 [mUA/g]; T=55°C y S=2,52%w/w.

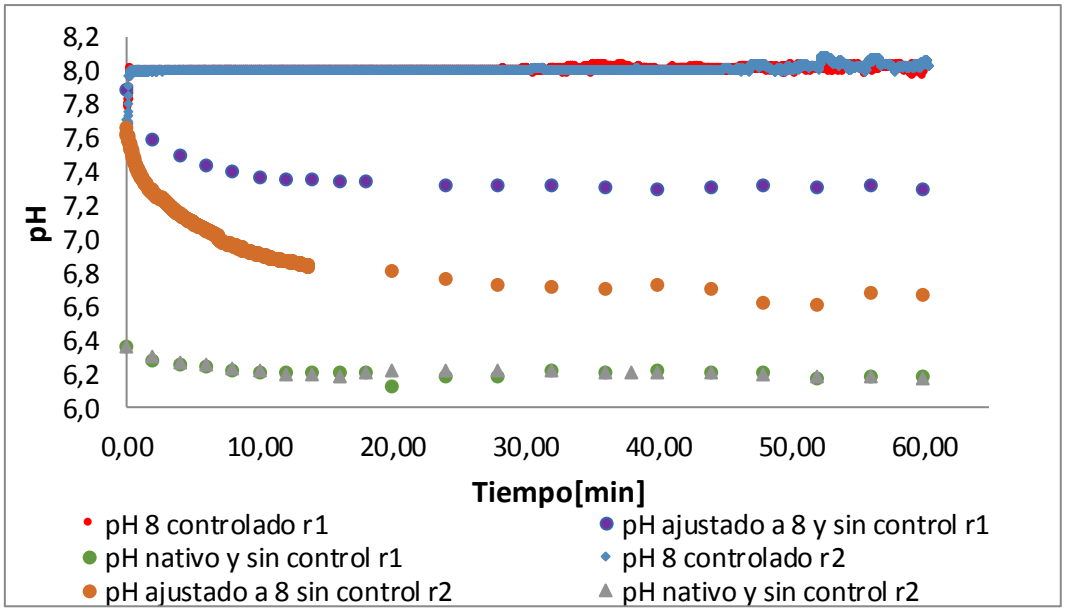

Figura 5.30. Cambio de pH en función del tiempo para los experimentos a condiciones de: pH 8 controlado, pH 8 ajustado y sin control, y pH nativo y sin control.

Se observa que la reacción alcanza una mayor producción de grupos α-amino cuando se lleva a cabo la hidrólisis a pH 8 controlado y cuando se ajusta el pH a 8 y sin controlar. Por otra parte, al hidrolizar a pH nativo y sin control se observa una menor producción de grupos α-aminos. Hidrolizar a pH nativo y sin control resultó ser un 22% menos productivo que el caso de controlar a pH 8 controlado. Esto se traduce en que al final de la reacción y del proceso de secado se obtendrá menor cantidad de producto, sin embargo, se gastará menos solución neutralizadora, por lo que se debería hacer un análisis más profundo de los costos y beneficios para corroborar si resulta en una mayor utilidad trabajar a pH nativo. Se observa que para los experimentos no controlados el pH disminuye durante los primeros 20 minutos luego tiende a mantenerse constante durante el resto de la reacción, el cambio de pH cuando no se controla concuerda con lo obtenido en los experimentos del diseño factorial donde el ΔpH no fue mayor que 0,2 unidades de pH. Sin embargo, cuando se ajusta el pH en el inicio y posteriormente se deja sin controlar se observa un ΔpH de 1,3 unidades de pH. Este cambio mayor de pH en el inicio de la reacción se puede explicar por la velocidad de reacción en los primeros instantes de la reacción donde ésta es mayor generando mayor cantidad de grupos α-aminos los cuales son responsables de la disminución del pH.

Para establecer si existen diferencias significativas entre utilizar un tratamiento y otro se utiliza un análisis **t pareado**, el cual posee la cualidad de comparar muestras que poseen dependencia de algún factor como es en este caso el tiempo.

La hipótesis nula para este caso es:

$$H_0: \mu_d = 0 \; vs \; H_1: \mu_d \neq 0 \tag{5.5}$$

Donde μ_d representa la media poblacional de las diferencias entre un tratamiento y otro, la Tabla 5.12 resume la cantidad de grupos α-amino liberados en función del tiempo, para los tres tratamientos, y sus respectivas diferencias entre uno y otro.

Tabla 5.12. Comparación de tratamientos a distintas condiciones de pH.

Tiempo [min]	1. grupos α-aminos a pH 8 fijo [mM]	2.grupos α-aminos a pH 8 inicial [mM]	3.grupos α-aminos a pH libre [mM]	d_{12}	d_{13}	d_{23}
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	47,2	40,6	23,1	6,6	24,1	17,4
4	59,7	55,5	31,6	4,2	28,1	23,9
5	39,4	38,9		0,5		
8	68,1	59,0	38,8	9,2	29,3	20,2
10	61,3	72,7		-11,4		
12	59,9	77,2	50,3	-17,3	9,6	26,9
20	78,7	92,2	60,3	-13,4	18,4	31,9
30	95,2	116,9	76,0	-21,7	19,2	40,9
45	117,1	128,2	85,5	-11,1	31,6	42,7
60	125,0	137,8	97,3	-12,8	27,6	40,4

*1: pH controlado a 8; 2: pH ajustado a 8 sin control, 3: pH nativo sin control.

El estadístico de prueba para esta hipótesis es:

$$t_0 = \frac{\bar{d}}{\frac{s_d}{\sqrt{n}}} \tag{5.6}$$

Donde $\bar{d}$ corresponde a la media de las diferencias y $s_d \; y \; n$ a la desviación estándar de las diferencias y a la cantidad de datos totales respectivamente.

La hipótesis nula $H_0: \mu_d = 0$ se rechaza si $|t_0| > t_{\frac{\alpha}{2},(n-1)}$. (Montgomery, 2004). La Tabla 5.13 muestra los valores obtenidos para los cálculos.

Tabla 5.13. Resultados de comparación de tratamientos

Ítem	d_{12}	d_{13}	d_{23}
$\bar{d}$	-6,1	20,9	27,1
s_d	10,5	10,4	13,8
$t_{\frac{\alpha}{2};gl_i}$	2,228	2,306	2,306
n	11	9	9
$\lvert t_0 \rvert$	1,927	6,021	5,904

*1: pH controlado en 8, 2: pH ajustado a 8 sin control, 3: pH nativo sin control

Observando los valores obtenidos para t_0 y contrastándolos con $t_{\frac{\alpha}{2},(n-1)}$ se puede establecer que no existen diferencias significativas entre hidrolizar a pH 8 controlado y a pH ajustado a 8 sin control. Sí existen diferencias significativas en la cantidad de grupos α-amino liberados entre el experimento a pH nativo sin control con respecto a los experimentos realizados a pH 8 controlado y pH ajustado a 8 sin control. Esto de sebe principalmente a que el pH afecta las propiedades catalíticas de la enzima, modificando la distribución de carga en su sitio activo y en la su superficie molecular, esto se traduce en que la enzima posea un rango de pH al que presenta una mayor actividad. Para el caso de la Alcalase el rango se encuentra entre pH 6 y 10.

Además, se realizó una comparación de los parámetros obtenidos para ver si existen diferencias significativas mediante una prueba de dos muestras, el resultado del ajuste al modelo logarítmico de las 3 curvas se muestra en la Tabla 5.14.

Tabla 5.14. Valores de parámetros experimentales a', b' y error estándar asociado al parámetro.

Experimento	pH 8 controlado	pH ajustado 8 sin control	pH nativo sin control
a'	29,7	21,2	12,2
b'	0,0355	0,0255	0,0348
se (a')	11,09	3,97	1,76
se (b')	0,00609	0,00273	0,00295

Para establecer si existen diferencias significativas la hipótesis nula es:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 \; vs \; H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \tag{5.7}$$

Y el estadístico de prueba es:

$$t_0 = \frac{x_1 - x_2}{S_p \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \tag{5.8}$$

Donde:

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1) \cdot S_1^2 + (n_2 - 1) \cdot S_2^2}{n_1 + n_2} \tag{5.9}$$

La hipótesis nula se rechaza si el valor del estadístico de prueba $t_0 > t_{0,025;n_1+n_2-2}$, o el caso que $t_0 < -t_{0,025;n_1+n_2-2}$.

Tabla 5.15. Resultados comparación de parámetros del modelo logarítmico.

Ítem	d_{12}	d_{13}	d_{23}
S_{p_a}	8,328	3,182	8,349
S_{p_b}	0,005	0,003	0,005
$t_{\frac{\alpha}{2};gl_i;gl_i}$	2,086	2,101	2,101
$-t_{\frac{\alpha}{2};gl_i;gl_i}$	-2,086	-2,101	-2,101
$\lvert t_0 \rvert_a$	2,397	6,329	-4,680
$\lvert t_0 \rvert_b$	4,969	-7,282	-0,330

*1: pH controlado a 8; 2: pH ajustado a 8 sin control, 3: pH nativo sin control.

Los resultados indican que para el parámetro a' los tres son significativamente distintos, para el caso de b' los parámetros son todos significativamente distintos excepto cuando para la hidrólisis a pH 8 controlado en comparación con el pH nativo sin control. Si se analiza las gráficas de hidrólisis se puede corroborar que la extensión de la hidrólisis a pH nativo es menor que a pH 8 controlado, sin embargo el parámetro b' asociado a estas dos curvas es

similar. Se puede inferir de esto que el parámetro b' no explica por si sólo la extensión de la reacción si no que ésta también se ve afectado por el parámetro a'.

Cuando se lleva a cabo la reacción de hidrólisis con control de pH se utiliza generalmente una solución base encargada de mantener el pH constante, la cual tiene consigo asociado un costo económico para la reacción de hidrólisis al ser un insumo más para el proceso. No controlar el pH de la hidrólisis permite una disminución del costo económico asociado al proceso.

5.2 Comparación de Energía de Secado

Caso 1: Comparación de tratamientos a distinta concentración de sustrato

A partir del análisis de las gráficas de correlación en el ítem 5.1.2 y la

Tabla 5.8 se determinó que el modelo, no resulta del todo confiable para predecir las respuestas, por lo que para efectos prácticos se utilizarán los parámetros a' y b' experimentales para realizar los cálculos de energía y productividad.

Se calculó el calor necesario para retirar el agua del sobrenadante obtenido, la cantidad de hidrolizado resultante, y el calor necesario para producir un gramo de hidrolizado en la fase de secado. La tabla muestra un resumen de los cálculos de energía para hidrolisis que se llevaron a cabo a 55°C, con una concentración inicial de enzima de 6,5 [mUA/g] y a concentración inicial de proteína de: (a) 2,52%w/w; (b) 3,78 %w/w; (c) 5,04 %w/w. Como se mencionó en el ítem 5.1.2 los parámetros utilizados para los cálculos fueron los experimentales. La Tabla 5.16 muestra los resultados para la evaluación.

Tabla 5.16. Comparación de energía y productividad a diferentes condiciones de S después de 60 minutos de reacción.

CASO 1	1	2	3
S % [m/m]	2,52	3,78	5,04
a' experimental	14,2	35,1	33,3
b' experimental	0,0332	0,0206	0,0277
Grupos amino [mM]	101,6	183,7	145,7
Fracción Soluble	0,65	0,45	0,25
Sobrenadante [g]	226,22	157,64	89,07
DH [%]	30,3	25,5	8,5
EN [%]	116,5	102,4	53,3
Masa nitrógeno [g]	1,6	2,2	1,5
PCL	3,3	3,9	11,7
Masa proteína [g]	10,3	13,3	9,4
Masa agua [g]	215,9	144,3	79,7
Calor sensible [kJ]	42,6	29,7	16,8
Calor latente [kJ]	487,4	325,8	179,8
Calor total [kJ]	530,0	355,5	196,6
Calor unitario [kJ/g]	51,6	26,7	20,9
Productividad [g/min]	0,171	0,226	0,157

Se observa que cuando se aumenta la concentración inicial de proteína se obtiene una mayor concentración de proteína hidrolizada en el sobrenadante, pero con un menor grado de hidrólisis, además se obtiene una fase soluble menor lo que se traduce en que la masa de proteína obtenida al final sea un poco menor, a pesar de esto se obtiene un menor costo energético para producir un gramo de hidrolizado. Se estima que se necesita 20,9 [kJ] para producir un gramo de hidrolizado de proteína cuando se trabaja a la máxima concentración inicial de proteína, que corresponde al caso en que no se añade agua, versus el caso de 51,6 [kJ] para producir un gramo de hidrolizado cuando se trabaja a una proporción 1:1 residuo/agua, equivalente a un 2,52% de concentración inicial de proteína. Por otra parte, la productividad al realizar una hidrólisis de 60 minutos es de 0,157 gramos de hidrolizado por minuto para una concentración inicial de proteína de 5,04%. Y de 0,171 gramos de hidrolizado

por minuto cuando se trabaja a una concentración inicial de proteína de 2,52%. Se observa que no existe diferencia en la productividad y que además se necesita de menor energía para producir un gramo de hidrolizado. Sin embargo, una variable importante a considerar es el grado de hidrólisis alcanzado y el largo promedio de proteína que se obtiene en cada caso, ya que un hidrolizado de grado de hidrolisis de 1-10% enfocado para mejorar propiedades funcionales y otro de grado de hidrólisis de 30% enfocado para dietas especiales, se venden a distintos precios en el mercado. Por otra parte, si se desea aumentar el grado de hidrólisis cuando se trabaja a una concentración mayor de sólidos, se puede o aumentar el tiempo de reacción, o añadir más enzima. El costo asociado a añadir enzima es mucho mayor en proporción que el costo de mantener el reactor funcionando, que el costo de agitación, el costo de calentamiento, costo de inactivación, costo de agua o cualquier otro costo asociado a la etapa de reacción como muestra la Figura 5.31 (Vera, 2016).

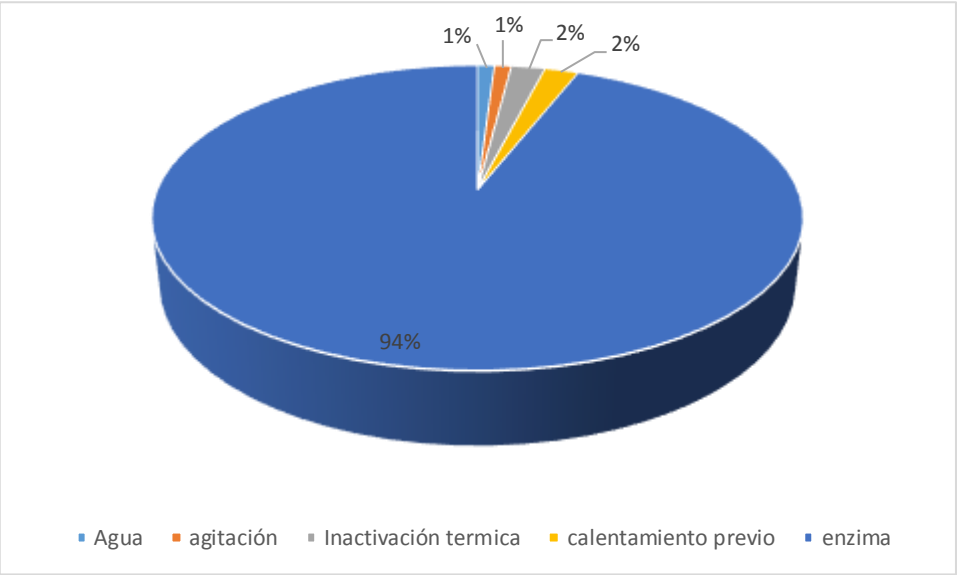

Figura 5.31. Distribución porcentual de costos para hidrólisis enzimática de residuos de pescado.

Fuente: (Vera, 2016)

Caso 2: Comparación de tratamientos a distintas condiciones de pH.

Los experimentos realizados a distintas condiciones de pH, también fueron evaluados en término de productividad, y energía necesaria en la fase de secado. La Tabla 5.17 muestra los cálculos hechos para los experimentos de hidrólisis en las condiciones de pH mencionadas.

Tabla 5.17. Comparación de energía y productividad a diferentes condiciones de pH después de 60 minutos de reacción.

CASO 2	pH 8 controlado	pH ajustado 8 sin control	pH nativo sin control
S %[m/m]	2,52	2,52	2,52
a' experimental	29,71	21,20	12,151
b' experimental	0,0355	0,0255	0,0348
Grupos amino [mM]	117,2	137,5	94,0
Fracción Soluble	0,65	0,65	0,65
Sobrenadante [g]	226,22	226,22	226,22
%DH	34,9	41,00	28,0
%EN	130,0	147,6	109,9
masa nitrógeno [g]	1,8	2,1	1,6
PCL	2,86	2,44	3,57
Masa proteína [g]	11,5	13,0	9,7
Masa agua [g]	214,8	213,2	216,5
Calor sensible [kJ]	42,6	42,6	42,6
Calor latente [kJ]	484,7	481,2	488,7
Calor total [kJ]	527,3	523,8	531,3
Calor unitario [kJ/g]	46,0	40,2	54,8
Productividad [g/min]	0,191	0,217	0,162

A partir de estos resultados se observa que para producir un gramo de hidrolizado se necesita 54,8 [kJ] cuando se trabaja a pH nativo sin control, 40,2 [kJ] cuando se ajusta el pH a 8 sin control libre y 46,0 [kJ] para para el caso de pH 8 controlado. Esto se explica que a bajo las mismas concentraciones de operación los experimentos ajustado y controlado a pH 8

obtienen una concentración levemente mayor de grupos amino, presentes en la misma cantidad de sobrenadante, lo que se traduce en una mayor masa de proteína. Si comparamos la productividad no se aprecia una diferencia entre uno y otro. Lo importante de estos resultados es que no existen mayores diferencias en los procesos de hidrólisis enzimática a pH 8 controlado y a pH ajustado a 8 y sin control, lo que permite postular que se puede generar un ahorro económico al realizar los procesos de hidrólisis enzimática de residuos de merluza ajustando el pH a 8 y luego no controlándolo, sin que esto tenga una repercusión en la cantidad de producto obtenido, ya que la cantidad de base añadida para ajustar el pH a 8 al inicio de la reacción en proporción corresponde al 40% de la base total utilizada para ajustar el pH a 8 y controlarlo durante toda la reacción. Otro factor a considerar es la posibilidad de hidrolizar a pH nativo, ya que lo que se pierde en productividad se puede ver compensado económicamente por el ahorro en la solución neutralizadora, para comprobar esto es preciso realizar un estudio económico que permita concluir si es conveniente o no económicamente.

Capítulo 6

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

De la investigación y trabajo experimental, se obtuvo que es factible realizar hidrólisis enzimática de subproductos de merluza a altas concentraciones de sólidos y sin control de pH debido a que la productividad cuando se utiliza un 100% de subproducto es sólo un 8% menor que cuando se utiliza subproducto y agua en la misma proporción. Además, la energía por unidad de masa necesaria para secar el hidrolizado es un 60% menor en los mismos casos mencionados anteriormente. Por otra parte, al no controlar el pH la productividad disminuye en un 15% comparado con la operación con pH 8 controlado, lo cual podría resultar compensado por el ahorro de álcali durante la reacción. En definitiva, el proceso podría mejorarse al no agregar agua en la mezcla de reacción y no controlar el pH. Sin embargo, se requiere un análisis económico de los costos e ingresos asociados al proceso de producción de hidrolizados que permitan verificar que efectivamente se obtiene una mejora bajo las condiciones anteriormente propuestas.

REFERENCIAS

7. REFERENCIAS

Acevedo, F., Gentina, J. C., & Illanes, A. (2004). *Fundamentos de Ingeniería Bioquímica*. (F. Acevedo, J. C. Gentina, & A. Illanes, Eds.) (Segunda Ed). Valparaíso: Ediciones Universitarias de Valparaíso.

Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *27*(May), 1256–1262. https://doi.org/10.1021/jf60226a042

Apar, D. K., & Özbek, B. (2009). A kinetic study on corn gluten hydrolysis. *Chemical Engineering and Technology*, *32*(4), 673–675. https://doi.org/10.1002/ceat.200800468

Ashwell, M. (2002). *Concepts of Functional Foods*. *Fst.Sagepub.Com*. Retrieved from http://fst.sagepub.com/content/3/4/306.2.full.pdf

Barros, R. M., & Xavier Malcata, F. (2004). A kinetic model for hydrolysis of whey proteins by cardosin A extracted from Cynara cardunculus. *Food Chemistry*, *88*(3), 351–359. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.046

Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína : procesos y aplicaciones Resumen. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, *42*(2), 227–237. https://doi.org/1851-6114

Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., & Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins1. *Journal of Dairy Science*, *66*(6), 1219–1227. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2

Cox, F., & Bravo, P. (2013). SECTOR PESQUERO y ACUÍCOLA I PANORAMA MUNDIAL. Retrieved from www.odepa.gob.cl

Cox, F., & Bravo, P. (2014). Sector pesquero: evolución de sus desembarques, uso y exportación en las últimas décadas. *Oficina De Estudios Y Políticas Agrarias*, *IV*, 14.

Demirhan, E., Apar, D. K., & Özbek, B. (2011). A Kinetic Study on Sesame Cake Protein

Hydrolysis by Alcalase. *Journal of Food Science*, *76*(1), C64–C67. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01938.x

Espinoza, K. (2014). *Correlación de propiedades funcionales y parámetros de operación de hidrolizados enzimáticos de músculo de salmón: Solubilidad y Capacidad antioxidante.* Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Técnica Federico Santa María.

Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO. (2014). *The State of World Fisheries and Aquaculture , 2014*. *FAO Fisheries Proceedings*. https://doi.org/92-5-105177-1

Illanes, A. (2008). *Enzyme biocatalysis: Principles and applications*. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7

Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *40*(1), 43–81. https://doi.org/: 10.1080/10408690091189266

Mackie, I. M. (1982). General review of fish protein hydrolysates. *Process Biochemistry*, *7*, 113–124. https://doi.org/doi:10.1016/0377-8401(82)90045-1

Marquez Moreno, M. C., & Fernandez Cuadrado, V. (1992). Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. *Process Biochemistry*, *28*(7), 481–490. https://doi.org/10.1016/0032-9592(93)85032-B

Mathworks. (n.d.). Central Composite designs. Retrieved from https://www.mathworks.com/help/stats/response-surface-designs.html?s_tid=srchtitle

Montgomery, D. (2004). Diseño y análisis de experimentos. *Limusa Wiley*.

Nielsen, P. M. (2001). Improved Method for Determining Protein Hydrolysis. *Journal of Food Science*, *66*(5), 642–646.

O'Meara, G. M., & Munro, P. A. (1985). Kinetics of the hydrolysis of lean meat protein by alcalase: Derivation of two alternative rate equations and their fit to experimental data.

Biotechnology and Bioengineering, *27*(6), 861–9. https://doi.org/10.1002/bit.260270616

Qi, W., & He, Z. (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model. *Frontiers of Chemistry in China*, *1*(3), 308–314. https://doi.org/10.1007/s11458-006-0026-9

Rebeca, B. D., Pena-Vera, M. T., & Diaz-Castaneda, M. (1991). Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases yield and nutritional value. *Journal of Food Science*, *56*(2), 309–314. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb05268.x

Sousa, R., Lopes, G. P., Tardioli, P. W., Giordano, R. L. C., Almeida, P. I. F., & Giordano, R. C. (2004). Kinetic Model for Whey Protein Hydrolysis By Alcalase Multipoint- Immobilized on Agarose Gel Particles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *21*(2), 147–153.

Spellman, D., McEvoy, E., O'Cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, *13*(6), 447–453. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00053-0

Tardioli, P. W., Sousa, R., Giordano, R. C., & Giordano, R. L. C. (2005). Kinetic model of the hydrolysis of polypeptides catalyzed by Alcalase?? immobilized on 10% glyoxyl-agarose. *Enzyme and Microbial Technology*, *36*(4), 555–564. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.12.002

Trusek-Holownia, A. (2008). Production of protein hydrolysates in an enzymatic membrane reactor. *Biochemical Engineering Journal*, *39*(2), 221–229. https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.09.010

Valencia, P., Cornejo, I., Almonacid, S., Teixeira, A. A., & Simpson, R. (2013). Kinetic Parameter Determination for Enzyme Hydrolysis of Fish Protein Residue Using D-optimal Design. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(1), 290–296. https://doi.org/10.1007/s11947-011-0628-1

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*(4), 589–597. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.028

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. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.11.012

Vera, O. (2016). *Evaluación económica de la operación de reactor enzimático para la hidrólisis de proteínas de subproductos de la industria pesquera*. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Técnica Federico Santa María.

ANEXOS

8. ANEXOS

8.1 Protocolos de análisis de muestras

8.1.1 Preparación de reactivo OPA

Para preparar 200 ml de reactivo OPA se pesan 7,620 g de Sodio tetraborato decahidrato (Borax) y 200 mg de Sodio dodecilsulfato (SDS) y se diluyen en aproximadamente 150 mL de agua destilada en un vaso precipitado de 500 mL, con un agitador magnético y a temperatura aproximada de 50°C para facilitar la disolución. Paralelamente se pesa 160 mg de O-ftaldialdehído (OPA) y se disuelve en 4 mL de Etanol al 99% en un vaso de 10 ml con una barra de agitación. Se requiere que ambas mezclas estén completamente disueltas antes de continuar. La solución de OPA es transferida cuantitativamente a la mezcla de Borax con SDS. Finalmente se agregan 0,176 mg de Ditiotreitol (DTT) a la mezcla. Se espera que se disuelva todo y que no queden rastros de los reactivos iniciales y se procede a aforar a 200 mL con agua destilada. Posteriormente se envasa en una botella y se cubre con papel aluminio para evitar el ingreso de luz.

8.1.2 Preparación de estándar de Serina

Para calibrar la solución de OPA previamente preparada se debe realizar una curva de calibración con el estándar de serina. El estándar de serina es preparado en diluciones entre 0 y 100 mg/L y se obtienen absorbancias aproximadas entre 0 y 0,7000 nm respectivamente como muestra la Figura 8.1. Para obtener la absorbancia se procede a tomar 200 µL de uno de los estándares de serina y se le agrega 1,5 mL de reactivo OPA en una celda de vidrio, se debe esperar 2 minutos para leer a 340 nm en el espectrofotómetro (Nielsen, 2001).

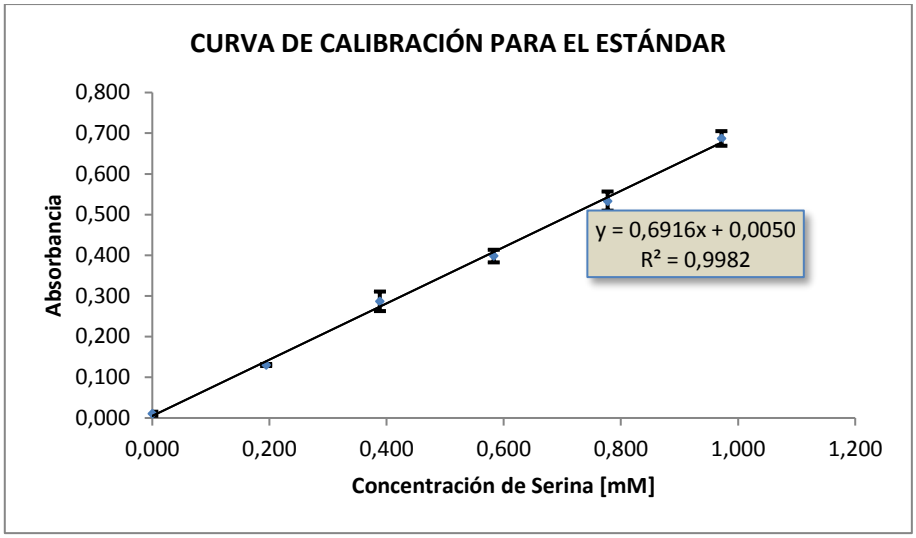

Figura 8.1. Curva de calibración para reacción de Serina con OPA.

8.1.3 Análisis OPA para determinación de grupos aminos libres.

Una vez que se ha construido la curva de calibración son serina, se puede medir la cantidad de grupos aminos libres mediante el reactivo OPA. Para la determinación de estos, la muestra se debe centrifugar a 5.000 g por 15 minutos y se colecta el sobrenadante. Se hace una dilución de 100 o 200 veces según corresponda y se procede a tomar 200 µL más 1,5mL de reactivo OPA en una celda de vidrio se esperan 2 minutos y se procede a realizar la lectura en el espectrofotómetro a 340 nm.