



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE SINALOA
MAESTRÍA EN CIENCIAS APLICADAS

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA PARCIAL Y DETERMINACIÓN DE
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE HIDROLIZADOS PROTEICOS OBTENIDOS DE
AGUA DE COLA DE SARDINA CRINUDA (*Opisthonema libertate*).**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS APLICADAS**

PRESENTA:

I.B.Q. Rosa María Sarmiento Machado.

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Jesús Aarón Salazar Leyva.

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. Emmanuel Martínez Montaña

Mazatlán, Sinaloa. Enero del 2019.

ÍNDICE

| | Página |
|--|---------------|
| RESUMEN | 8 |
| ABSTRACT | 10 |
| CAPÍTULO I | 12 |
| INTRODUCCIÓN | 13 |
| ANTECEDENTES | 17 |
| Situación Actual de la Industria Pesquera Mundial y Mexicana | 17 |
| Subproductos de la Industria Pesquera Reductora | 18 |
| Impacto Medioambiental de los Desechos de la Industria Procesadora Pesquera | 21 |
| Agua de Cola | 22 |
| Producción de Hidrolizados Proteínicos de Subproductos Pesqueros | 25 |
| Actividad Antioxidante de Hidrolizados Proteicos de Agua de Cola | 27 |
| Estrés oxidativo | 29 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 32 |
| JUSTIFICACIÓN | 33 |
| HIPÓTESIS. | 34 |
| OBJETIVOS | 35 |
| Objetivo General | 35 |
| Objetivos Específicos | 35 |
| CAPÍTULO II | 36 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 37 |

| | |
|--|----|
| Materia Prima | 37 |
| Obtención de Hidrolizados Proteicos a Partir del Agua de Cola | 37 |
| Evaluación del Grado de Hidrólisis | 38 |
| Caracterización Bioquímica de Hidrolizados Proteicos | 39 |
| Contenido de Humedad | 39 |
| Contenido de Cenizas | 40 |
| Contenido de Lípidos Crudos | 40 |
| Contenido de Proteína Cruda | 41 |
| Determinación de Pesos Moleculares de los Péptidos | 42 |
| Determinación de Aminoácidos | 43 |
| Determinación de la Actividad Antioxidante <i>in vitro</i> | 44 |
| Actividad de Inhibición del Radical DPPH | 44 |
| Reducción del radical ABTS | 45 |
| Potencia Antioxidante Reductora Férrica (FRAP) | 47 |
| Análisis Estadístico | 47 |
| CAPÍTULO III | 49 |
| RESULTADOS | 50 |
| Evaluación del Grado de Hidrólisis | 50 |
| Caracterización Bioquímica del Agua de Cola e Hidrolizados Proteicos | 51 |
| Análisis Proximal del Agua de Cola y sus Hidrolizados | |
| Proteicos | 51 |
| Determinación de Pesos Moleculares de los Hidrolizados Proteicos | 52 |
| Determinación del Contenido de Aminoácidos Presentes en el Agua de | |

| | |
|---|----|
| Cola e Hidrolizados Proteicos | 53 |
| Determinación de la Capacidad Antioxidante del Agua de Cola y sus Hidrolizados Proteicos | 56 |
| Actividad de Inhibición del Radical DPPH | 56 |
| Reducción del Radical ABTS | 59 |
| Potencia Antioxidante Reductora Férrica (FRAP) | 63 |
| CAPÍTULO IV | 67 |
| DISCUSIONES | 68 |
| Evaluación del Grado de Hidrólisis | 68 |
| Caracterización Bioquímica del Agua de Cola e Hidrolizados Proteicos | 70 |
| Análisis Proximal | 70 |
| Determinación de Pesos Moleculares | 73 |
| Determinación del Contenido de Aminoácidos | 75 |
| Determinación de la Capacidad Antioxidante del Agua de Cola y sus Hidrolizados Proteicos | 78 |
| Reducción del Radical DPPH | 78 |
| Reducción del Radical ABTS | 80 |
| Potencia Antioxidante Reductora Férrica (FRAP) | 81 |
| CAPÍTULO V | 83 |
| CONCLUSIONES | 84 |
| CAPÍTULO VI | 86 |
| PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN | 87 |
| REFERENCIAS | 88 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Diagrama de proceso de fabricación de harina de pescado indicando la obtención del agua de cola tras la centrifugación de la fase líquida (modificado de Ezquerro, 2014) | 21 |
| 2 | Monitoreo del grado de hidrólisis (GH) del agua de cola usando la enzima comercial Alcalasa® (relación E/S de 3%, a un pH de 9.0, a 55 °C). Las barras de error indican desviación estándar del tiempo al cual fue alcanzado el grado de hidrólisis deseado. | 49 |
| 3 | Efecto del grado de hidrólisis (GH) de los hidrolizados proteicos de AC de sardina crinuda a una concentración de 5 mg/mL, sobre el porcentaje de inhibición o eliminación del radical DPPH. Actividad expresada como (A) porcentaje de inhibición y (B) Trolox equivalentes (TEAC). Las barras de error indican desviación estándar de los datos. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ($P < 0.05$). | 58 |
| 4 | Concentración media efectiva (EC_{50}) en mg/mL de los HP a distintos GH, estimada mediante la eliminación del 50% de los radicales DPPH presentes en la solución. Los valores con distintas letras indica diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos. Las barras de error indican desviación estándar de los datos. Se muestra el EC_{50} del estándar Trolox para efectos de comparación. | 59 |
| 5 | Efecto de la concentración de agua de cola centrifugada (ACC) y de | 60 |

sus hidrolizados a distintos grados de hidrólisis (GH) sobre el porcentaje de reducción del radical ABTS. Las barras de error indican la desviación estándar de los datos.

- 6 Concentración media efectiva (EC_{50}) en mg/mL del ACC y sus HP a distintos GH, determinada mediante la eliminación del 50% de los radicales ABTS presentes en la solución de prueba. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ($P < 0.05$). Se muestra el EC_{50} del estándar Trolox para efectos de comparación. Las barras de error indican desviación estándar de los datos. 61
- 7 Efecto del grado de hidrólisis de los HP de AC de sardina crinuda sobre la actividad antioxidante reportada en equivalentes Trolox, medida por la reducción del radical ABTS a una concentración de la muestra de 5 mg/mL. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ($P < 0.05$). Las barras de error indican desviación estándar de los datos. 62
- 8 Efecto del grado de hidrólisis (GH) de hidrolizados proteicos de agua de cola de sardina crinuda y su concentración sobre la potencia reductora férrica (FRAP). Las barras de error indican desviación estándar de los datos. 64
- 9 Efecto del grado de hidrólisis de los HP de AC de sardina crinuda sobre la potencia reductora férrica (FRAP) expresada en equivalentes Trolox, para las muestras a una concentración de 5 mg/mL. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ($P <$ 65

0.05).

ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|-------|---|--------|
| 1 | Análisis proximal del agua de cola cruda (AC) y agua de cola centrifugada (ACC). Los valores están expresados en % (medias \pm desviación estándar) de la masa húmeda total. | 51 |
| 2 | Análisis proximal de liofilizados de agua de cola cruda (LAC), centrifugada (LACC) y de sus hidrolizados proteicos (HP). Los valores están expresados en % (medias \pm desviación estándar) de la masa seca total. | 52 |
| 3 | Distribución de pesos moleculares (% de los péptidos totales) del agua de cola centrifugada (ACC) y sus hidrolizados proteicos. | 53 |
| 4 | Perfil de aminoácidos (% del total de AA) en el agua de cola centrifugada (ACC) y sus hidrolizados proteicos (HP) a diferentes grados de hidrólisis (5, 10, 15 y 20%). | 55 |
| 5 | Comparación de las técnicas DPPH, ABTS y FRAP a una misma concentración (5 mg/mL), expresado en equivalentes de Trolox (TEAC) del agua de cola centrifugada (ACC) y sus hidrolizados proteicos (HP) a distintos grados de hidrólisis. | 66 |

RESUMEN

Uno de los productos pesqueros elaborados a gran escala a nivel mundial es la harina de pescado, durante su producción se genera un subproducto líquido llamado agua de cola (AC), el cual puede ser empleado como una fuente de proteínas para generar productos de alto valor comercial como son los concentrados e hidrolizados proteicos. Los hidrolizados de proteína (HP) de pescado han sido reconocidos por poseer distintas capacidades funcionales y bioactivas, entre de ellas la actividad antioxidante entre otras, lo cual los hace atractivos para su uso en la industria alimentaria y/o farmacéutica; sin embargo, la información de HP obtenidos a partir de efluentes pesqueros es escasa. Por lo que, en este trabajo de investigación, se evaluaron las propiedades antioxidantes de HP obtenidos mediante hidrólisis enzimática del AC generada en la producción de harina de sardina crinuda (*Opisthonema libertate*). **Métodos.** Se determinó la composición proximal del AC. Se obtuvieron HP de AC con distintos grados de hidrólisis (GH; 5, 10, 15 y 20%), empleando la proteasa comercial Alcalasa®. El GH se determinó con la técnica del pH-stat. Las condiciones empleadas para realizar el proceso de hidrólisis proteica fueron: relación enzima/sustrato (E/S = 3%); masa proteica (5g/100 mL); pH (9); y temperatura (55°C). El perfil de pesos moleculares de los HP se determinó mediante cromatografía líquida de exclusión molecular. Se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* de los HP mediante las técnicas de DPPH, FRAP y ABTS. **Resultados.** Se encontraron valores de 91.9%, 5.9%, 1.8% y 1.1% para el contenido de humedad, proteína, cenizas y grasas respectivamente del AC. El HP con GH de 20% fue el que exhibió la mayor actividad antioxidante, mediante la técnica de inhibición del radical DPPH. Asimismo, el HP de 15% GH reportó los valores más altos de actividad antioxidante mediante las técnicas de inhibición del radical ABTS y potencia reductora férrica (FRAP), ambos valores se reportaron en TEAC (mg de Trolox/mg de muestra, respectivamente). Se encontró que para el HP con un

20% de GH, el 62.4% de los péptidos totales contenidos, mostraban un peso molecular menor a 1.35 kDa; sin embargo, el HP de 15% GH reporta el porcentaje de péptidos totales mayor (47.2%) en el intervalo de PM de 1.35 a 17 kDa. Los aminoácidos presentes en mayor porcentaje para el HP de 15% GH corresponden a Glu (14.1%), Gly (11.8%), His (11.1%), Asp (8.4%), Ala (8.4%) y Arg (6.9%), siendo este hidrolizado el que presenta la capacidad antioxidante *in vitro* más alta. **Conclusiones.** La obtención de HP (con un 15% GH) a partir de AC, representa una alternativa viable para producir compuestos bioactivos (antioxidantes) con alto valor comercial, se sugiere la evaluación de su capacidad antioxidante *in vivo* en futuros estudios.

Palabras claves: *Agua de cola; actividad antioxidante; hidrolizado proteico; propiedad bioactiva; subproducto pesquero.*

ABSTRACT

The fishmeal is one of the main fish products manufactured at a worldwide scale; during its production a byproduct called stick-water (SW) is generated, which could be used as a protein source to generate products with high commercial value such as protein concentrates and hydrolysates. Protein hydrolysates (PH) from fish have shown functional and/or bioactivity capacities, such as antioxidant activity among others, which make them interesting for their application in food and pharmaceutical industry; however, the background about PH obtained from effluents is scarce. Therefore, in this research work, the antioxidant properties of PH obtained by enzymatic hydrolysis of SW from Pacific thread herring (*Opisthonema libertate*) were evaluated. **Methods.** The proximal composition of the SW was determined. PH of SW were obtained with different degree of hydrolysis (DH; 5, 10, 15 and 20%), using the commercial protease Alcalase®. The DH was determined with the pH-stat technique. The conditions used to carry-out the protein hydrolysis process were: enzyme/substrate ratio (E/S = 3%); protein mass (5 g/100 mL); pH (9); and temperature (55° C). The molecular weight profile (MW) of the PH was determined by size-exclusion liquid chromatography. *In vitro* antioxidant activity of PH was evaluated using DPPH, FRAP and ABTS assay. **Results.** 91.9% on moisture content, 5.9% of protein, 1.8% of ash and 1.1% of fat were found in SW. The highest DPPH antioxidant activity was exhibited by PH with 20% DH. Moreover, PH with 15% DH showed the highest antioxidant activity through the ABTS and FRAP assays, both values reported in TEAC (mg Trolox/mg sample, respectively) It was found that 62.4% of total peptides contained in the PH, showed a molecular weight lower than 1.35 kDa; however, PH of 15% DH shown the highest percentage of total peptides (47.2%) with a MW range of 1.35 to 17 kDa. The amino acids present in higher concentrations for PH of 15% DH correspond to Glu (14.1%), Gly (11.8%), His (11.1%), Asp (8.4%), Ala (8.4%) and Arg

(6.9%), this protein hydrolysate presents the highest antioxidant capacity *in vitro*.

Conclusions. The production of PH (with a 15% DH) from SW could represent an alternative to produce bioactive compounds (antioxidants) with high commercial value. We suggest the *in vivo* evaluation of the antioxidant capacity from PH of stick-water in further studies.

Keywords: *Antioxidant activity; bioactive property; fishery by-product; protein hydrolysate; stick-water.*

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En México se capturan alrededor de 1.4 millones de toneladas anuales de productos pesqueros (FAO, 2018). Se ha establecido, que de la gran mayoría de las operaciones pesqueras destinadas a la producción de mariscos y pescados para consumo humano, un 60% de lo capturado es manejado como residuos (Shahidi, 2006). Hay que señalar que los residuos son aquellos componentes que ya no pueden ser utilizados para el consumo humano u obtención de productos de valor agregado; en cambio, los subproductos o co-productos son los componentes que pueden ser reciclados o aprovechados después de un tratamiento determinado (Aspevik *et al.*, 2017). Entre los ejemplos más comunes de subproductos sólidos provenientes del procesamiento de organismos marinos destacan la piel, exoesqueletos, huesos, cabezas, vísceras, entre otros (Ferraro *et al.*, 2013). El manejo más común de estos subproductos consiste en su utilización para la fabricación de alimentos para animales tras su procesado y reincorporación a la harina de pescado; sin embargo, cuando dichos subproductos no son procesados o reutilizados, son vertidos sin ningún tratamiento al mar o bien en zonas aledañas a las costas o áreas de cultivo de los organismos (SEMARNAT, 2012), convirtiéndose en potenciales focos de contaminación y generación de fauna nociva.

Los llamados solubles de pescado implican todos los subproductos de la industria pesquera predominantemente hidrosolubles, aunque la mayoría de las veces se les menciona como solubles de pescado condensados, indicando con esto que la condensación o evaporación juega un papel importante en su producción. Estos solubles de pescado provienen, por lo general, del agua de cocción, sanguaza y agua de cola (denominadas en el idioma inglés como cook-water, blood-water y stick-water, respectivamente) los cuales son producidos por las plantas productoras de harina de pescado (Valdez, 2006).

En la producción de harina de pescado, tras los procesos de molienda, cocción de la materia pesquera, y una vez extraído el mayor porcentaje de sólidos mediante su prensado, el líquido pasa a las centrifugas para separar los aceites de los líquidos hidrosolubles residuales, conociéndose a estos últimos como agua de cola (AC).

Para maximizar el uso de estos subproductos de la pesca, la hidrólisis es uno de los métodos más utilizados para reusar la proteína y así aumentar su valor comercial (Klomklao y Benjakul, 2018).

Los hidrolizados proteicos (HP) se definen como una mezcla de péptidos de distintos tamaños y/o aminoácidos libres provenientes de la hidrólisis de proteínas, realizada ya sea por métodos químicos (utilizando ácidos o álcalis), fermentativos (usando bacterias tales como las ácido-lácticas) o enzimáticos (usando proteasas). Este último método es de los más utilizados, ya que ofrece ventajas con respecto a los otros, entre las que destacan: la selectividad de las enzimas, mejor control del grado de hidrólisis, utilización de condiciones moderadas de temperatura y pH evitando así la aparición de compuestos potencialmente tóxicos o de baja palatabilidad (Bucci *et al.*, 2000). Aunado a lo anterior, la hidrólisis enzimática no utiliza compuestos químicos tóxicos y además preserva las propiedades nutricionales y genera propiedades funcionales tecnológicamente interesantes en los productos obtenidos, lo que facilita su aplicación en la industria farmacéutica y alimentaria (Najafian, 2012). Además, la hidrólisis enzimática de proteínas de fuentes animales de origen marino genera péptidos con diversas propiedades bioactivas tales como antioxidantes, antihipertensivas, inmunomoduladoras, antimicrobianas, entre otras (Wu *et al.*, 2015; Aspevik *et al.*, 2017; Chew *et al.*, 2018; Klomklao y Benjakul, 2018). Se han empleado una gran diversidad de materias primas como fuentes proteicas para obtener HP con propiedades bioactivas y se ha

puesto especial atención en las proteínas de origen marino de bajo valor comercial, así como las obtenidas de subproductos pesqueros.

En lo que se refiere a la actividad antioxidante, se sugiere que ésta se encuentra relacionada con la capacidad que poseen algunas biomoléculas, tales como proteínas y péptidos entre una gran diversidad, de evitar la oxidación de componentes biológicos, gracias al atrapamiento de radicales libres y especies químicas que contienen oxígeno, tales como las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), así como la capacidad que poseen de atrapar o quelar metales (Rustad, 2012). Actualmente, distintos compuestos antioxidantes son utilizados en forma de suplementos alimenticios, debido a que pueden proteger a los organismos de los daños provocados por especies reactivas de oxígeno, reduciendo así el riesgo de padecimiento de enfermedades crónico-degenerativas como por ejemplo cáncer, diabetes, enfermedades coronarias, entre las principales (Najafian, 2012).

En la industria alimentaria se emplean antioxidantes sintéticos, entre los que se encuentran 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metilfenol (BHT) y el 2-tert-butil-4-hidroxianisol (BHA); sin embargo, se ha descrito la posible toxicidad de estos compuestos sobre el organismo humano (Espín *et al.*, 2007). Es por ello que actualmente ha aumentado el interés por identificar compuestos con propiedades antioxidantes y su aislamiento a partir de fuentes naturales, especialmente péptidos derivados de hidrolizados de proteínas alimentarias de varias especies de organismos marinos (Khantaphant *et al.*, 2011).

Por todo lo anterior, la obtención de los HP de subproductos pesqueros representa una excelente oportunidad para el diseño de productos funcionales que podrían ocasionar una mejora en la salud tanto de animales como de los seres humanos, a través del efecto quimiopreventivo que brindan las propiedades bioactivas exhibidas por los mismos (Chalamaiah, 2012). Estas actividades biológicas podrían ser una alternativa a diferentes

medicamentos o compuestos sintéticos ya que, a diferencia de éstos, los HP por lo general carecen de efectos adversos en el organismo (Zhang *et al.*, 2012).

En general, los subproductos de pescado son utilizados en muchas industrias y sus aplicaciones comerciales se han expandido año con año. Sin embargo, su aplicabilidad como fuente para la producción de compuestos bioactivos y valor nutraceútico no ha sido estudiada lo suficiente, por lo que hace falta investigación al respecto para dar una aplicación en la promoción de la salud humana.

ANTECEDENTES

Situación Actual de la Industria Pesquera Mundial y Mexicana.

La producción pesquera, resultado de la captura o la acuicultura, ha mantenido un crecimiento sostenido en las últimas cinco décadas. El crecimiento de esta actividad, se debe principalmente a un aumento significativo del consumo de pescado y otras especies acuáticas en últimas fechas, lo que ha mejorado las dietas de las personas a nivel mundial gracias a la ingesta de alimentos diversificados y alta calidad nutricional. De acuerdo a la FAO (2018), la producción total de pescado alcanzó en el 2016 un máximo histórico de 171 millones de toneladas, de éstas el 88% se utilizaron para el consumo humano directo. Como resultado de esta producción, en 2016 se registró un consumo mundial *per cápita* de 20.3 kg/persona, que también supone un máximo histórico (FAO, 2018).

Asociado a la abundancia de especies marinas de interés comercial, la pesca es considerada una de las principales actividades productivas en México, ya que en promedio se reportan capturas de aproximadamente 1.3 millones de toneladas anuales de productos pesqueros (FAO, 2018). La industria procesadora de productos marinos genera ganancias significativas por exportación, pero a la par genera distintos tipos de subproductos y residuos que son pobremente utilizados. No obstante, estos subproductos son fuente potencial de varios componentes funcionales tales como proteínas, enzimas, pigmentos, colágeno, gelatina, aceites, ácidos grasos, quitina, calcio y otros minerales (Rustad, 2003; Asbjorn, 2004; Arvanitoyannis y Kassaveti, 2008), que debido a sus propiedades bioquímicas poseen potencial para ser aprovechados en varias industrias tales como la agrícola, alimentaria, farmacéutica, acuicultura, curtidora de pieles, bioenergética, entre otras (Ezquerro, 2014).

Subproductos de la Industria Pesquera Reductora.

En la industria pesquera, aproximadamente un 60% del total de biomasa que es procesada no es aprovechada y se consideran como desechos o subproductos entre los cuales se incluyen la piel, las cabezas, branquias, vísceras, el hígado, los huesos, sangre y las huevas. Estas estructuras contienen una importante cantidad de materiales ricos en proteínas que normalmente son convertidas en otros productos o ingredientes en forma de harinas, las cuales posteriormente son empleados para la formulación y elaboración de alimentos destinados a la cría y engorda de animales. En ocasiones, una fracción de subproductos es convertida en distintos tipos de fertilizantes utilizados en actividades agrícolas y acuícolas (SAGARPA, 2016).

Con el fin de aprovechar estos desechos de la industria pesquera y aumentar el valor de especies acuícolas subutilizadas o de bajo valor comercial, varias investigaciones giran en torno a la elaboración de hidrolizados de proteína, los cuales son el resultado de la acción enzimática que transforma las proteínas a péptidos de variables tamaños o pesos moleculares, los cuales pueden estar formados de 2 a 20 aminoácidos (Chalamaiah, *et al.*, 2012). Si bien, la revalorización de la industria pesquera se ha centrado en emplear a los subproductos como una fuente potencial de compuestos con mayor valor agregado. No obstante, en muchos casos se carece de la infraestructura y protocolos optimizados para su aprovechamiento, por lo que en estos casos suelen ser vertidos o eliminados al medio ambiente, sin un tratamiento previo, lo que tiene un impacto negativo, ya que se convierten en una fuente de contaminación y potencial generadora de fauna nociva. De los desechos resultantes de la producción de harina de pescado, los llamados “solubles de pescado” (efluentes que contienen una gran cantidad de compuestos hidrosolubles principalmente de tipo proteico), son de los desechos pesqueros de mayor preocupación en materia ambiental por la alta contaminación que generan (Galarza *et*

al., 2001). Dentro de estos efluentes se incluyen agua de bombeo usualmente salobre, sanguaza, agua de cola, agua de cocción, condensados y agua de enfriamiento (Cabrera, 2002; Méndez, 2009).

En México para la elaboración de harina de pescado, generalmente se emplea como materia prima diferentes especies de pelágicos menores, siendo las más comúnmente utilizadas para este propósito la sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*), macarela (*Scomber japonicus*), diferentes especies de anchoveta (*Engraulis mordax*, *Cetengraulis mysticetus*) y arenque del Pacífico (*Clupea pallasii pallasii*) (Guerrero *et al.*, 1998). Se ha reportado que proteínas solubles e insolubles provenientes de arenque del Atlántico (*Clupea harengus*) poseen potencial para utilizarse como suplemento nutricional y emulsificante (Sathivel *et al.*, 2004, 2005). También se ha reportado que diversos subproductos sólidos de la industria pesquera reductora poseen actividad antioxidante, entre los que se encuentran cabezas de atún (Bougatef *et al.*, 2012), subproductos de camarón (*Penaeus monodon* y *Penaeus indicus*) (Dey y Dora, 2011) y en subproductos de sardina (*Sardinella aurita*) (Bougatef *et al.*, 2010), entre otros. Sin embargo, a la fecha es escasa la bibliografía reportada de trabajos de investigación sobre efluentes líquidos. Entre los pocos se encuentra el trabajo reportado por Amado (2013), quien tras analizar efluentes generados durante distintas etapas (descongelado, ablandamiento, cocción y gelificación) del procesado del cefalópodo sepia argentina (*Illex argentinus*), registró actividad antioxidante y antihipertensiva en ellos. A su vez, Pérez-Santín *et al.*, (2013) estudiando agua de cocción de camarones (*Penaeus spp.*) reporta actividad antioxidante y antihipertensiva de péptidos derivados de este efluente. También Tang *et al.*, (2015) reportaron actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus* en agua de cocción de la anchoveta japonesa (*Engraulis japonicus*). Por lo anteriormente descrito, es posible considerar que los desechos líquidos provenientes de la industria pesquera

reductora de sardina crinuda poseen potencial para aislar o elaborar compuestos con capacidad bioactiva, los cuales los hacen interesantes para su revalorización y reutilización en la industria alimenticia y farmacéutica, principalmente.

Impacto Medioambiental de los Desechos de la Industria Procesadora Pesquera

Zonas y ambientes que rodean a las industrias procesadoras de productos pesqueros, son potenciales para verse impactados negativamente debido a la descarga de residuos orgánicos, como lo son escamas, sanguaza, aguas de cola, cocción y lavado y compuestos ricos en grasas, que al ser vertidos al medio sin un tratamiento previo, llegan a formar sedimentos negruzcos con olores sulfurosos o provocar la eutrofización de cuerpos de agua aledaños, tales como lagunas costeras, esteros, entre otros, lo cual causa un desequilibrio en las propiedades físicas, químicas y biológicas de dichos sistemas (Ezquerro, 2014). Estas propiedades, se ven afectadas por cambios en la salinidad (principalmente su incremento), disminución del oxígeno disuelto por incremento de su demanda bioquímica y biológica (DQO y DBO, respectivamente), incremento de los nutrientes, alta carga de sulfuros y compuestos nitrogenados (p. ej. Nitritos, nitratos y amonio) en sedimentos y aguas, así como al incremento de la temperatura por contaminación térmica o por procesos bioquímicos exotérmicos, todo esto puede llevar a condiciones que puede provocar la muerte de organismos (Cabrera, 1999).

Para evitar los problemas antes mencionados, en México se han formulado normas (NOM-001-ECOL-1996) para regular las descargas de la industria del procesamiento de pescados y mariscos con el fin de minimizar la contaminación acuática (SEMARNAT, 2016).

En lo referente a la generación de enfermedades en el humano, debido al contacto directo de las personas con los efluentes pesqueros o aguas contaminados con estos, se observa la aparición de enfermedades del sistema respiratorio y digestivo, así como enfermedades alérgicas, infecciosas y parasitarias, a pesar de que estos eventos podrían estar asociados a actividades industriales pesqueras, aún no hay estudios epidemiológicos que lo

confirmer. No obstante, se ha reportado un incremento en las patologías antes mencionadas cuando las plantas de procesamiento pesquero entran en actividad (Majluf, *et al.*, 2007).

Por lo que la adecuada disposición y/o aprovechamiento de los residuos de la industria pesquera es necesaria, ya que, por un lado, permite minimizar el impacto ambiental y la disminución del efecto adverso en la salud, y por otro, permite dar un valor agregado a residuos generados por esta industria.

Agua de Cola

El agua de cola es uno de los desechos líquidos (efluentes), que se generan en la elaboración de harina de pescado. El método más común de producción de harina y aceite de pescado básicamente consiste en el cocinado a vapor de la materia prima, y su posterior prensado, centrifugado y secado (Figura 1) (Ezquerro, 2014).

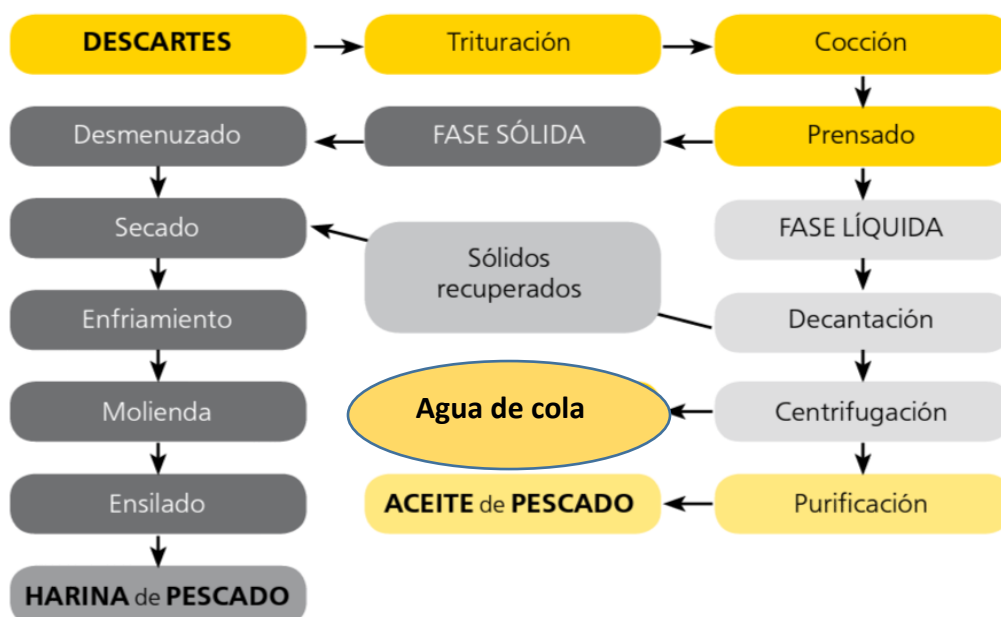


Figura 1. Diagrama de proceso de fabricación de harina de pescado indicando la obtención del agua de cola tras la centrifugación de la fase líquida (modificado de Ezquerro, 2014).

Durante la etapa de prensado se extrae el mayor porcentaje de sólidos, y se genera un líquido que pasa a las centrífugas para separar a los aceites, luego a los líquidos residuales (fase acuosa) se les conocen como agua de cola (AC). Esta es una emulsión de aceite en agua, en la cual el aceite, aunque ya en baja concentración, es acompañado de proteínas y otros compuestos orgánicos. La composición del AC puede variar dependiendo de la especie de pescado, época de captura, estado fisiológico de los organismos, condiciones de almacenamiento del mismo y del manejo operacional de la planta pesquera reductora (Del Valle y Aguilera, 1991; García -Sifuentes *et al.*, 2009). El AC es rica en proteínas tales como colágeno, lo cual ha quedado de manifiesto en un estudio realizado por García (2007), quien reportó que el AC de la industria sardinera de Guaymas, Sonora, México, contenía el 10% de las proteínas totales provenientes de proteínas globulares (p.ej. pigmentos respiratorios y albúminas) y de estructuras corporales tales como piel y escamas principalmente; por lo tanto, el AC puede ser considerada una fuente de proteínas, que posee un adecuado perfil de aminoácidos esenciales (Ockerman y Hansen, 2000).

En cuanto a sus características fisicoquímicas, el AC posee un pH promedio de 6.5, aunque con frecuencia se trata químicamente para disminuirlo a 4.5 y prevenir con esto el crecimiento bacteriano y retardar o evitar su descomposición, lo cual a su vez estabiliza el contenido de vitaminas y diversos compuestos liposolubles aún presentes (García-Sifuentes *et al.*, 2009). El AC posee una coloración café (Del Valle y Aguilera, 1991). A su vez, el AC es fuente potencial de vitaminas, tales como la vitamina B12, así como de otras vitaminas hidrosolubles como la riboflavina, niacina y ácido pantoténico (González, 1996). El AC proveniente de subproductos (cabezas, colas, vísceras y piel) de abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*) y de algunas especies de salmónidos (*Oncorhynchus sp.*), posee características

nutricionales y funcionales para poder emplearse como mejoradores de sabor o atrayentes en piensos para animales pecuarios y acuícolas (Bechtel, 2005).

El AC proveniente de la elaboración de harina de pescado, posee un contenido promedio de sólidos totales, proteína, grasas, cenizas y humedad de 8–10%, 5.6%, 0.6%, 1.8% y de 92%, respectivamente (Goycoolea *et al.*, 1997). Sin embargo, existen diferencias en la composición dependiendo de la especie de donde se obtiene, de tal manera que Valdez (2006) trabajando con AC de sardina crinuda (*Opisthonema libertate*) reportó valores de humedad, proteína, grasa y ceniza de 88.8%, 5.2%, 2.2% y 2.0%, respectivamente. El mismo autor reportó una composición para el AC de sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*) de 91.0%, 3.0%, 5.1% y 1.4% para el contenido promedio de humedad, proteína, grasa y cenizas, respectivamente (Valdez, 2006). Por su parte, Pacheco-Aguilar (2009) estudió la composición proximal del AC producida por la industria sardinera de Guaymas, Sonora, en donde trabajó con AC proveniente de una mezcla de sardina crinuda, Monterey y anchoveta (*Engraulis mordax*) y se registraron valores promedio para sólidos totales, proteínas, cenizas y grasas de 9.5%, 4.7%, 1.7% y 1.8%, respectivamente.

Investigaciones recientes, (Wu *et al.*, 2018; Hung *et al.*, 2014) se dirigen hacia el estudio de los componentes de los efluentes de la pesca, esto con la finalidad de encontrar aplicaciones a los sólidos solubles y sedimentables, así como de biomoléculas específicas presentes en ellos tras su aislamiento; considerando que el AC se genera continuamente en las plantas reductoras y que anteriormente se consideraba un desperdicio y frecuentemente se descargaban al mar o zonas aledañas sin previo tratamiento, las investigaciones enfocadas en la recuperación y revalorización de este efluente son importantes. Además, a la fecha son cada vez más las plantas procesadoras que incorporan estos procesos, ya que el aporte que significa la recuperación de los sólidos contenidos en el agua de cola, se refleja en una mayor

producción de harina de pescado bajo ciertas condiciones inocuas, además de lograr reducir la generación de residuos y un aumento en las ganancias de las empresas (Ahumada *et al.*, 2004). Lo anterior, resulta indispensable para propiciar un incremento de la competitividad de las plantas procesadoras en el mercado actual, lo que les permite permanecer en operación bajo las actuales condiciones de regulación normativa de descargas y generación de residuos de la industria procesadora (García-Sifuentes, 2009).

En lo que respecta al potencial de uso del AC en relación con su composición y funcionalidad, se ha reportado que aquella proveniente de subproductos (cabezas, aletas, vísceras y piel) de abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*) y salmón (*Oncorhynchus sp.*), posee características nutricionales y funcionales para poder emplearse como mejoradores de sabor y atrayentes en piensos para animales pecuarios y acuícolas (Bechtel, 2005). Además, el contenido de aminoácidos esenciales presentes en las harinas provenientes de proteínas solubles de cabezas, colas, vísceras, piel y mezclas de recortes de abadejo de Alaska, cubre los requerimientos reportados para humanos, lo cual permite suponer que estos pueden ser usados en la industria de alimentos como ingrediente funcional y de enriquecimiento nutricional (Sathivel y Bechtel, 2006). Así mismo, existen reportes (Hung *et al.*, 2014) del empleo de subproductos pesqueros (la mayoría sólidos) incluyendo efluentes, que pueden ser empleados como materia prima para la producción de hidrolizados proteínicos.

Producción de Hidrolizados Proteínicos de Subproductos Pesqueros

La hidrólisis enzimática es el proceso en el cual, una molécula se escinde como consecuencia de la adición de una molécula de agua; esta reacción se produce cuando uno de los fragmentos de la molécula original gana un ion hidrógeno (H^+) de la molécula de agua,

mientras que el otro fragmento recoge el grupo hidroxilo restante (OH^-), reacción cuya catálisis es mediada por una enzima de la clase hidrolasa (Kumar *et al.*, 2011).

El uso de procesos hidrolíticos para la conversión de subproductos pesqueros en productos de alto valor, son tecnologías que se emplean comúnmente. Por ejemplo, el uso de proteasas es una alternativa interesante para la valorización de subproductos de pescado en diferentes mercados (Aspevik, 2017). Al hidrolizar las proteínas se pueden mejorar diversas características funcionales, tales como la solubilidad, viscosidad, capacidad de emulsificación y dispersión, características que brindan ventajas para el uso en muchos productos alimenticios frente a las proteínas originales (Benítez *et al.*, 2008). Por otra parte, al hidrolizar una proteína aumenta potencialmente la biodisponibilidad de los aminoácidos que la conforman. Además, muchos de los péptidos obtenidos producto de la hidrólisis, llegan a mostrar propiedades bioactivas que pueden incidir en forma benéfica a numerosas funciones fisiológicas en los organismos a los cuales se les proporcionen (Gómez-Guillén *et al.*, 2011).

La hidrólisis enzimática de proteínas provenientes de subproductos pesqueros es una manera eficiente de recuperar y/o generar péptidos bioactivos, por lo que es necesario abundar en los estudios de hidrolizados proteicos ya que estos representan una importante fuente de compuestos con potencial quimiopreventivo frente a diversas enfermedades crónico-degenerativas como cáncer, Alzheimer, diabetes, entre otras (Ezquerro, 2014).

Como resultado de la hidrólisis enzimática de proteínas se obtienen péptidos y aminoácidos, cuya composición final dependerá de la fuente proteica, del tipo de enzima o mezcla de enzimas utilizadas, de las condiciones físicas y químicas de hidrólisis y del grado de hidrólisis alcanzado en la reacción (Benítez *et al.*, 2008). Para la producción de estos hidrolizados y la obtención de péptidos y aminoácidos, se han utilizado distintas proteasas comerciales, entre las que se han reportado tripsinas, quimotripsinas, pepsinas, Alcalasa

(subtilisina), properasa E, pronasa, colagenasa, bromelina y papaína (Kim *et al.*, 2001; Mendis *et al.*, 2005; Lin, 2006). La especificidad de las proteasas afecta al tamaño de los péptidos, composición de aminoácidos libres, tipo de péptidos y la secuencia de aminoácidos que los componen, lo que a su vez influye en las propiedades bioactivas de los hidrolizados (Wu *et al.*, 2003), por lo que cualquier modificación en el proceso tiene como resultado cambios composicionales y funcionales del hidrolizado producido.

Actividad Antioxidante de Hidrolizados Proteicos de Agua de Cola

La actividad antioxidante *in vitro* puede medirse mediante la capacidad de algún compuesto antioxidante de atrapar o secuestrar radicales sintéticos, como lo es el 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, por sus siglas en inglés) o el ácido 2-2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazonil-6-sulfónico) (ABTS), o el poder de reducir el ion Fe^{+3} a Fe^{+2} , lo que se conoce como potencia antioxidante reductora férrica (FRAP, por sus siglas en inglés) (Ngo *et al.*, 2010).

Se han obtenido hidrolizados proteicos con capacidad antioxidante *in vitro* a partir de subproductos de pescado (Deng *et al.*, 2008; Hsu, 2010; Bougateg *et al.*, 2010, 2012), calamar gigante (*Dosidicus gigas*) (Alemán *et al.*, 2011; Mendis *et al.*, 2005), camarón (*Penaeus monodon* y *Penaeus indicus*) (Bueno-Solano *et al.*, 2009; Dey y Dora, 2011; Huang *et al.*, 2011), equinodermos (Mamelona *et al.*, 2010) y diferentes especies de moluscos bivalvos (Wang *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2012), músculo de pez caballa (*Scomber scombrus*) (Wu *et al.*, 2003), gelatina de piel de pescado (Mendis *et al.*, 2005) y de esqueletos de atún (Je *et al.*, 2009). También se ha encontrado actividad antioxidante en hidrolizados proteicos del procesamiento de subproductos de piel de pez piedra (*Synanceia horrida*) trabajando con las enzimas Alcalasa®, flavourzima, neutrasa y protamex (Kim *et al.*, 2010).

Los hidrolizados de proteínas de subproductos derivados de muchas especies de peces como hoki (*Macruronus novaezelandiae*) (Mendis *et al.*, 2004), bacalao (*Gadus morhua*) (Gerard *et al.*, 2003) y caballa (*Scomber scombrus*) (Wu *et al.*, 2003) han demostrado actividades antioxidantes, debido a su alto contenido de los aminoácidos Tyr, Trp, Met, Lys, Cys e His, que actúan como donadores de protones para reaccionar con los electrones desapareados de los radicales libres. La hidrólisis enzimática despliega la estructura de las proteínas para exponer o liberar estos aminoácidos y conduce a un incremento de la actividad antioxidante de los subproductos de especies marinas digeridos en comparación con la proteína intacta (Sarmadi *et al.*, 2010). El peso molecular de los péptidos presentes en los hidrolizados de proteína tienen influencia sobre las propiedades antioxidantes, existiendo así estudios en los que se atribuye la bioactividad principalmente a esta característica, como ejemplo se pueden mencionar los trabajos de Hsu *et al.*, (2009), quienes a partir de agua de cocción de atún (*Thunnus tonggol*) aislaron tres secuencias de péptidos, que comprendían de 4 a 10 aminoácidos cuyas estructuras de los péptidos fueron Pro-Val-Ser-His-Asp-His-Asp-His-Ala-Pro-Glu-Tyr (con un peso molecular de 1,305 Da), Pro-Ser-Asp-His-Asp-His-Glu (P.M de 938 Da) y Val-His-Asp-Tyr (P.M. de 584 Da). También Hsu *et al.*, (2009) a partir de agua de cocción de atún (*Thunnus tonggol*) aislaron dos péptidos con actividad antioxidante cuyas secuencias eran Leu-Pro-Thr-Ser-Glu-Ala-Ala-Lys-Tyr (P.M. de 978 Da) y Pro-Met-Asp-Tyr-Met-Val-Thr (P.M. de 756 Da). Por su parte, Je *et al.*, (2007) usando como enzima Alcalasa®, encontraron actividad antioxidante en péptidos aislados con la siguiente secuencia Val-Lys-Ala-Gly-Phe-Ala-Trp-Thr-Ala-Asn-Gln-Gln-Leu-Ser siendo el peso molecular de este péptido de 1,519 Da.

Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo ha sido clásicamente definido como el desequilibrio entre los mecanismos fisiológicos responsables de la producción y la neutralización de compuestos reactivos capaces de causar un daño molecular oxidativo (Fernández *et al.*, 2009). Jones (2006) definió el estrés oxidativo como “el desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, en favor de los primeros, que conduce a una ruptura del control y señalización fisiológica que normalmente ejerce el sistema REDOX, conduciendo a un daño molecular”.

Se han encontrado múltiples aplicaciones para los compuestos antioxidantes, tanto en la industria química como en la de alimentos, de manera que estos protegen a los diversos materiales potencialmente oxidables contra el estrés oxidativo, el cual se define como el daño provocado por especies reactivas de oxígeno (ERO) (Ezquerro, 2014).

Las ERO son tóxicas para las células, y entre ellas se encuentran el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidróxilo (OH^{\bullet}), el peróxilo (ROO^{\bullet}), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los hidroperóxidos y los peroxinitritos. Estas especies reactivas de oxígeno, incluidos los radicales libres, son responsables del daño celular que se podría producir indirectamente por procesos oxidativos sobre moléculas potencialmente oxidables tales como ácidos grasos insaturados, proteínas y ácidos nucleicos (Plaza del Moral, 2010).

En condiciones normales, las ERO y los radicales libres son eliminados eficazmente por sistemas de defensa antioxidante, tanto enzimáticos (p. ej. catalasas, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa) como no enzimáticos (vitamina E, vitamina C, glutatión, entre otros). Sin embargo, en condiciones patológicas, se rompe el equilibrio entre la generación y eliminación de ERO, dando como resultado el deterioro de macromoléculas como el ácido desoxirribonucleico (ADN), los lípidos de membrana celular y las proteínas. Se cree que la generación no controlada de radicales libres que atacan los lípidos de membrana, proteínas y

ADN, se encuentra implicada en muchos trastornos de la salud como diabetes mellitus, cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias y enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Alzheimer (Qian *et al.*, 2008; Johansson *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010). Por ello, el consumo de fuentes antioxidantes externas resulta esencial para compensar las consecuencias perjudiciales del estrés oxidativo (Ratnam *et al.*, 2006).

A su vez, la oxidación de lípidos es uno de los principales procesos de deterioro en muchos tipos de alimentos, lo que lleva a los cambios en la calidad de los alimentos y su valor nutricional, o la aparición de compuestos potencialmente tóxicos. La oxidación de lípidos ha sido reconocida por ser una de las principales causas de muchas enfermedades humanas graves, como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer y los trastornos neurológicos, así como el proceso de envejecimiento (Herman 1980; Kinsella 1987). Es por esto que es importante inhibir la oxidación de los lípidos y la formación de radicales libres que se producen en los alimentos y en los organismos (Kris-Etherton *et al.*, 2002). Para hacer frente al problema previamente mencionado, distintos tipos de antioxidantes, tanto naturales como sintéticos, han sido ampliamente utilizados; sin embargo, se sospecha que los antioxidantes sintéticos, como el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroquinona (TBHQ) y propil galato (PG), que son comúnmente utilizados para retardar la oxidación en alimentos (Balti *et al.*, 2011) podrían ser responsables de toxicidad a largo plazo, e incluso su uso en los alimentos está restringido o prohibido en algunos países (Madhavi *et al.*, 1996). Por lo tanto, existe un interés creciente por los antioxidantes naturales, especialmente los péptidos derivados de proteínas alimentarias hidrolizadas (Khantaphant *et al.*, 2011). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, es aún escasa la bibliografía reportada de trabajos de investigación sobre hidrolizados provenientes de efluentes líquidos, entre los que podemos encontrar los estudios realizados por Amado (2013) que encontró actividad antioxidante y

antihipertensiva en hidrolizados provenientes de efluentes generados durante distintas etapas de procesamiento (descongelado, ablandamiento, cocción y gelificación) del calamar argentino Ilex (*Illex argentinus*). A su vez Pérez-Santín *et al.*, (2013), evaluó la actividad antioxidante de hidrolizados de agua de cocción de camarones (*Penaeus spp.*). Así mismo, Hsu *et al.*, (2009) evaluaron la actividad antioxidante de péptidos en agua de cocción de atún (*Thunnus tonggol*).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los residuos y subproductos provenientes de la industria pesquera, particularmente de la reductora, al ser descargados directamente al ambiente, sin un tratamiento adecuado, son una fuente potencial de contaminación y fauna nociva (potenciales vectores de patógenos) en las zonas costeras de nuestra región. Estos subproductos son ricos en biomoléculas de interés alimentario, que pueden ser revalorizadas por métodos tales como la hidrólisis enzimática para la generación de péptidos con propiedades bioactivas, lo que puede sentar las bases para el aprovechamiento de los subproductos pesqueros líquidos, ya que desafortunadamente, estos subproductos son escasamente explotados comercialmente. Dentro de estos subproductos se encuentra el agua de cola, ésta posee una gran cantidad de materia orgánica (principalmente de origen proteico y lipídico), pero a pesar de que constituye un subproducto de gran volumen en esta industria, existe poca información científica referente a la obtención y caracterización de hidrolizados proteicos con propiedades antioxidantes a partir de ella (la mayoría de las investigaciones se han dirigido a evaluar desechos o subproductos sólidos). Por lo tanto, mediante este trabajo de investigación, se busca evaluar la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos de agua de cola de sardina crinuda (*Opisthonema libertate*), con la finalidad de generar información base, para identificar potenciales propiedades bioactivas generadas mediante su hidrólisis enzimática a diferentes grados de hidrólisis, lo que eventualmente permitirá el aprovechamiento de este subproducto, enfocado principalmente a aplicaciones biotecnológicas, farmacéuticas y nutricionales, para mejorar la salud animal y humana.

JUSTIFICACIÓN

La realización de este estudio proporcionará información necesaria para sentar las bases que en un futuro permitan establecer estrategias de aprovechamiento y valorización al agua de cola proveniente de la industria pesquera reductora. Esto a través del desarrollo de estrategias biotecnológicas dirigidas a la producción de compuestos con bioactividad con potencial de ser aplicados en la industria farmacéutica y de alimentos tanto animal como humana. Al recuperarse y aprovecharse eficientemente estos subproductos se reduce el impacto ambiental que generan y se contribuye a mejorar el manejo de los residuos y subproductos pesqueros en empresas de la región.

HIPÓTESIS

Los hidrolizados proteicos de agua de cola de sardina crinuda (*Opisthonema libertate*) con grados de hidrólisis superiores al 10%, poseen una mayor actividad antioxidante *in vitro* debido al elevado contenido de péptidos de bajo peso molecular generados en el proceso.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto del grado de hidrólisis sobre las propiedades bioquímicas y antioxidantes de hidrolizados proteicos obtenidos a partir de agua de cola proveniente de la industria procesadora reductora de sardina crinuda (*Opisthonema libertate*).

Objetivos Específicos

1.- Elaborar hidrolizados proteicos a partir de agua de cola de sardina crinuda usando la enzima comercial Alcalasa® con diferentes grados de hidrólisis (5, 10, 15 y 20 %).

2.- Caracterizar bioquímicamente los hidrolizados proteicos obtenidos a partir de agua de cola de sardina crinuda (composición proximal, perfil de aminoácidos, perfil de pesos moleculares).

3.-Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* (mediante las técnicas de DPPH, ABTS y FRAP) de los hidrolizados proteicos obtenidos a partir de agua de cola de sardina crinuda.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia Prima

El agua de cola (AC) de sardina crinuda (*Opisthonema libertate*) se recolectó directamente del proceso de producción de harina de sardina crinuda en la planta procesadora de pescado MAZ INDUSTRIAL S.A. de C.V ubicada en Mazatlán, Sinaloa, México durante el mes de febrero del 2017. Se realizó el muestreo de AC con el apoyo del personal de la planta. Las muestras de agua de cola se obtuvieron posterior al proceso de centrifugado (en la cual se extraen los lípidos) y antes de su entrada a los evaporadores. Las muestras se recolectaron en contenedores plásticos de 19 L, obteniendo un promedio de 17 L, a una temperatura de 90°C; posteriormente se trasladaron al Laboratorio de Compuestos Naturales Bioactivos de la Universidad Politécnica de Sinaloa, donde se transfirieron a frascos de 1 L para su almacenamiento a una temperatura de aproximadamente -20°C, hasta su posterior utilización.

Obtención de Hidrolizados Proteicos a Partir del Agua de Cola

El AC cruda fue previamente tratada mediante una centrifugación a 13000×g durante 45 minutos a temperatura ambiente, recuperándose el sobrenadante y el precipitado desechado. Posteriormente, el AC centrifugada (ACC) fue sometida a un proceso de hidrólisis enzimática utilizando la enzima comercial Alcalasa® (subtilisina A, EC 3.4.21.62; Sigma P4860) La hidrólisis enzimática se realizó a las condiciones recomendadas por el fabricante: pH 9 a 55°C (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca). Se utilizó la metodología del pH-stat (Adler-Nissen, 1986), con la finalidad de obtener hidrolizados proteicos (HP) con diferentes grados de hidrólisis (GH) y monitorear en tiempo real la reacción enzimática.

La relación enzima/substrato (E/S) y el tiempo de hidrólisis fueron determinados mediante ensayos preliminares, teniendo como objetivo la obtención de hidrolizados proteicos con diferente GH (5, 10, 15 y 20%). Una vez alcanzado el GH deseado, la reacción hidrolítica se detuvo llevando la mezcla de reacción a una temperatura de 90°C por 15 minutos con el objetivo de desnaturalizar la enzima. Posteriormente, se enfrió la mezcla y se centrifugó a 13000×g, por 30 min, a una temperatura de 4°C. Los sobrenadantes obtenidos que corresponden a las fracciones solubles (hidrolizados proteicos), se colocaron en frascos de polietileno cerrados para su congelación y posterior liofilizados. Las muestras liofilizadas se almacenaron a -20°C, en bolsas de polietileno sellados para su posterior análisis. Los hidrolizados proteicos y los análisis realizados para su caracterización bioquímica, fueron realizados por triplicado.

Evaluación del Grado de Hidrólisis

El grado de hidrólisis (GH) se calculó utilizando la metodología del pH-stat, la cual se basa en medir el volumen de una solución de NaOH de normalidad conocida y que es consumida durante la reacción para mantener el pH a un valor constante. El grado de hidrólisis se calculó empleando la siguiente ecuación (Adler-Nissen, 1986):

$$\text{GH (\%)} = V_B \times N_B \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{MP} \times \frac{1}{htot} \times 100\% \quad \text{Ecuación (1)}$$

Dónde:

V_B : representa el volumen de NaOH utilizado para mantener el pH a un valor determinado constante (de 9.0 para el presente trabajo).

N_B : es la normalidad de la base (para el presente trabajo se utilizó una concentración de 0.1 N).

$1/\alpha$: es el grado de disociación de los grupos α -amino a condiciones conocidas de pH y temperatura (para este caso, a un pH de 9.0 a 55 °C, $1/\alpha = 1.01$) (Navarrete del Toro y García Carreño, 2002).

MP: es la masa de proteína (g) presente en la mezcla de reacción (5g de proteína cruda en un volumen de reacción total de 100 mL, para el presente trabajo).

htot: representa el número de enlaces peptídicos presentes en la fuente de proteína utilizada para la hidrólisis (meqv α -amino/g de proteína). De acuerdo a lo reportado por Adler-Nissen (1986) se utilizó el valor de 8.6, por referirse a un concentrado de proteína de pescado.

Caracterización Bioquímica de Hidrolizados Proteicos

La composición proximal se determinó para las muestras liofilizadas del AC centrifugada (ACC) y para los HP obtenidos con diferentes grados de hidrólisis (5, 10, 15 y 20% de GH).

Contenido de Humedad

El análisis de humedad se realizó por el método de estufa de convección, manteniendo las muestras a 105 °C por 24 horas hasta alcanzar un peso constante de acuerdo a lo recomendado por la AOAC (2010). Los porcentajes de humedad se calcularon de acuerdo con la ecuación 2:

$$\% \text{ Humedad} = \left(\frac{M_s}{M_h} \right) \times 100\% \quad \text{Ecuación (2)}$$

Dónde:

M_h = Peso de muestra húmeda

M_s = Peso de muestra seca

Contenido de Cenizas

Las cenizas se estimaron por calcinación de las muestras en una mufla a 550 °C por 8 horas de acuerdo a lo recomendado por la AOAC (2010). El porcentaje de cenizas se calculó mediante la ecuación 3:

$$\% \text{ Cenizas} = \left[\frac{P_{ms} - P_c}{P_m} \right] \times 100\% \quad \text{Ecuación (3)}$$

Dónde:

P_{ms} = Peso de muestra calcinada en un crisol

P_c = Peso del crisol

P_m = Peso de la muestra fresca

Contenido de Lípidos Crudos

Los lípidos totales se determinaron por extracción con solventes usando una mezcla de cloroformo: metanol (2:1 v/v) según el método modificado de Folch *et al.* (1956). Se pesó de 0.4 a 0.6 g de muestra, a esta se le agregó agua destilada (0.5 mL), 2 mL de metanol y 4 mL de cloroformo, se homogenizó por 2 minutos y se dejó reposar por un periodo de 24 horas. Posteriormente, se adicionó 1.5 mL de una solución de KCl al 1.76% y se dejó reposar para la separación de fases. Posteriormente, se separó la fase cloroformo y esta se colocó en un frasco ámbar (a peso constante), se evaporó el solvente (usando temperatura >80 °C) en una campana de extracción y se llevó a peso constante el frasco con los lípidos extraídos. Se pesó el tubo más lípidos (frasco ámbar) y se calculó el contenido de lípidos totales con la siguiente fórmula (Ecuación 4):

$$\% \text{ Lípidos} = \frac{m_1 - m_0}{\text{gramos de muestra}} \times 100\% \quad \text{Ecuación (4)}$$

Dónde:

m_1 = Peso seco en gramos del frasco y lípidos extraídos

m_0 = Peso del frasco en gramos

Contenido de Proteína Cruda

Se determinó el porcentaje de proteína cruda por medio de la cuantificación de nitrógeno por el método micro-Kjeldahl. Se introdujeron 0.05 g de la muestra seca en un matraz Kjeldahl y se agregaron 1.5 g de K_2SO_4 , 0.05 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y 3 mL de H_2SO_4 concentrado. Los matraces se calentaron hasta que la muestra digerida presentó un color verde-azul, esta se enfrió y posteriormente se cambió la solución a un matraz de aforación de 25 mL. Una muestra de 5 mL del digerido fue agregada a un destilador micro-Kjeldahl, luego se agregó una solución de 0.1N de NaOH dentro de la cámara de ebullición, para que por arrastre de vapor se destilara el nitrógeno total presente en la muestra.

El producto de la destilación (nitrógeno libre arrastrado por vapor) se condensó y recibió sobre una solución que contenía 15 mL de ácido bórico en solución acuosa al 2%, así como el indicador Shiro-Tashiro para determinar cambios de pH. Después de que se obtuvo un volumen de 40 mL de destilado, se retiró la solución condensada y se tituló con HCl 0.02 N hasta que se obtuvo el primer vire de color en la solución.

El porcentaje de proteína se calculó con las siguientes fórmulas (Ecuaciones 5 y 6):

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(m-b) \times N \text{ HCl} \times 14.007}{V_m} \times 100\% \quad \text{Ecuación (5)}$$

Dónde:

m = mL de HCl consumido por la muestra hasta que la coloración viró

b = mL de HCl consumido por el blanco

$N \text{ HCl}$ = Normalidad del HCl utilizado en la titulación

14.007 = miliequivalentes de nitrógeno

V_m = es el volumen de la muestra en 5 mL

Luego, a partir del contenido de nitrógeno, este se multiplicó por un factor de conversión de la muestra para obtener el porcentaje de proteína cruda total en la muestra analizada.

$$\% \text{ Proteínas} = \%N \times 6.25 \quad \text{Ecuación (6)}$$

Dónde:

%N = Porcentaje de nitrógeno en la muestra.

6.25 = Factor de conversión para proteína de pescado.

Determinación de Pesos Moleculares de los Péptidos

La determinación de pesos moleculares se realizó en muestras liofilizadas del agua de cola centrifugada (ACC), y a los HP a diferentes grados de hidrólisis (5, 10, 15, 20%). Se estimó la distribución de pesos mediante la técnica de exclusión molecular acoplada a un cromatógrafo de líquidos de alta presión (SEC-HPLC, por sus siglas en inglés) (Varian™ Pro Star). Para ello cada muestra se disolvió en una fase móvil que consistía de una solución amortiguadora de 150 mM de fosfato de sodio a pH 7. Se usó una columna (Agilent Bio SEC-5™) de 4.6 mm de diámetro interno y 300 mm de longitud. Se tomaron en exceso 50 μ L de la muestra y fueron inyectados al cromatógrafo (se ocupan 20 μ L solamente). El flujo de la fase móvil fue isocrático a una velocidad de 0.4 mL/min. La absorbancia se monitoreó a una longitud de onda de 254 nm usando un detector de arreglo de diodos (DAD) marca Varian™ Pro Star y el software Galaxy™ versión 1.9.302.952. Para poder determinar el peso molecular de las fracciones peptídicas presentes en las muestras analizadas de acuerdo a sus respectivos tiempos de retención, se utilizó un estándar de péptidos (BIORAD, 151-1901) que contenía

cinco compuestos de tamaños conocidos (Tiroglobulina, 670 kDa; Gamma-globulina, 158 kDa; Ovoalbúmina, 44 kDa; Mioglobina, 17 kDa; y Vitamina B₁₂, 1.35 kDa).

Determinación de Aminoácidos

Las muestras por analizar fueron previamente desgrasadas de acuerdo a la metodología propuesta por Folch (1957), para lo cual se pesaron 0.3 g de HP o 0.5 g de los HP de agua de cola centrifugada liofilizada. Por cada parte de una muestra analizar, se homogenizó con 20 partes de reactivo Folch (2:1, cloroformo: metanol), dejándose en agitación durante 3 horas, para posteriormente agregar 1.26 mL de H₂O, y dejar reposar toda la noche. Al día siguiente se extrajo la fase inferior (la cual contiene cloroformo y lípidos), dejando exclusivamente la fase superior en el tubo, el cual se metió a la estufa a 80°C hasta secar completamente. Se determinó por diferencia la cantidad de grasa removida.

Para la determinación de aminoácidos primarios, se pesó 3 mg de muestra seca y desgrasada, en un tubo de hidrólisis, para luego adicionar la misma cantidad de antioxidante (tioglicolato de sodio) en estado sólido. Posteriormente, se adicionó a cada uno de los tubos 3 mL de una solución 6 M HCl. Tras la extracción del aire de los tubos, estos fueron cerrados y colocados en una placa de calentamiento para su hidrólisis a una temperatura de 150 °C por un tiempo de 6 horas. Una vez hidrolizadas las muestras, estas fueron transferidas a un rotavapor para la evaporación total del HCl. Las muestras deshidratadas fueron resuspendidas con 2 mL de buffer de citrato a pH 2.2. A dicha resuspensión se le determinó los aminoácidos primarios mediante el método de HPLC.

Para el análisis cromatográfico de los aminoácidos, las muestras se derivatizaron usando *o*-phtalaldehido (OPA; Fluoropa™, Pierce, Rockford, IL). La separación

cromatográfica se realizó en un equipo HPLC Agilent Technologies™ 1100, usando una columna de fase reversa (300 Extent-C18™, Zorbax Agilent, 4.6 × 150 mm). Para realizar la corrida cromatográfica, se utilizó un gradiente usando como solvente A una solución buffer de acetato 0.1M, pH 7.2, con 1% de tetrahidrofurano y como solvente B metanol grado HPLC, manteniendo un flujo de 1.2 mL/min. Un detector de fluorescencia fue ajustado para mantener como longitudes de onda de excitación/emisión de 350 nm/450 nm. Para calcular la concentración de los aminoácidos se utilizó como estándar interno el ácido α -aminobutírico.

Determinación de la Actividad Antioxidante *in vitro*.

Actividad de Inhibición del Radical DPPH

La actividad de eliminación de radicales DPPH (2,2'-difetil-1-picril-hidrazil) se determinó de acuerdo con el método modificado de Wu *et al.*, (2013). Se tomaron alícuotas de 100 μ L de soluciones acuosas (en concentraciones de 2.5 a 50 mg/mL) de ACC y los distintos HP (5, 10, 15, 20% de GH); posteriormente, se añadió 900 μ L de una solución metanólica de DPPH a 0.3 mM. La mezcla se dejó en reposo por 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. A la solución resultante se le midió absorbancia a una longitud de onda de 517 nm. El control se preparó de la misma manera excepto que se usó agua destilada en lugar de la muestra. El estándar se realizó con Trolox (Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), marca Sigma-Aldrich el cual es un análogo de la vitamina E. La actividad de inhibición del radical DPPH se calculó a partir de la siguiente ecuación (Ecuación 7):

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \frac{a-b}{a} \times 100\% \quad \text{Ecuación (7)}$$

Dónde:

a= Absorbancia del control de DPPH

b= Absorbancia después de incubar 30 min la muestra con el DPPH

También se realizó una estimación de la concentración media efectiva (EC₅₀) con la cual la muestra sería capaz de inhibir el 50% de los radicales presentes en la solución de prueba, bajo las condiciones experimentales utilizadas. Para ello se verificó con los datos experimentales el ajuste del modelo lineal ($y = mx + b$; $r^2 > 0.98$) del porcentaje de inhibición DPPH (y) por efecto de la concentración de las muestras (x). Una vez determinada la regresión lineal y ecuación correspondiente, se estimó el valor de EC₅₀ (Ecuación 8):

$$EC_{50} \text{ de la inhibición de radicales DPPH} = \frac{50 - b}{m} \quad \text{Ecuación (8)}$$

Dónde:

b= El valor de la ordenada al origen de la curva obtenido mediante la regresión lineal

m= El valor de la pendiente de la ecuación de la línea recta

Reducción del Radical ABTS

La actividad de eliminación de radicales de ABTS se determinó con algunas modificaciones de la técnica descrita por Przygodzka *et al.* (2014). El radical ABTS (ABTS^{•+}) (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico)) se activó con 16 horas de anticipación. Para ello, 9.6 mg de radical ABTS se disolvieron en condiciones de oscuridad en 2.5 mL de agua desionizada, también se preparó una solución de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) (18.9 mg disuelto en 500 µL de agua desionizada protegido de la luz). Luego, se tomaron 44 µL de la solución de K₂S₂O₈ y se agregaron a la solución de ABTS, se agitó y se dejó reaccionar en la oscuridad durante 16 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se

tomó 500 μL del radical activado y se añadió 40 mL de agua, se ajustó a una absorbancia entre 0.8-0.9 a una longitud de onda de 734 nm. Para el ensayo de ABTS, 2.9 mL de la solución de ABTS y 100 μL de la muestra se mezclaron en una celda de 4 mL. Después de 10 minutos, la absorbancia se leyó a una longitud de onda de 734 nm. Todas las reacciones fueron realizadas a temperatura ambiente. Como muestra blanco, se empleó etanol al 80% y como estándar se utilizó Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), el cual es un análogo de la vitamina E. El porcentaje de reducción del radical ABTS se determinó mediante la siguiente ecuación (9):

$$\% \text{ Inhibición ABTS} = \frac{a-b}{a} \times 100\% \quad \text{Ecuación (9)}$$

Dónde:

a = La absorbancia de la solución de ABTS antes de añadir el extracto (tiempo cero)

b = La absorbancia de la solución de ABTS después de 10 minutos de adición de la muestra.

La concentración media efectiva (EC_{50}) con la cual la muestra es capaz de eliminar el 50% de los radicales de ABTS presentes en la solución de prueba, bajo las condiciones experimentales utilizadas, se determinó una vez realizada la verificación de ajuste al modelo lineal ($y = mx + b$, $r^2 > 0.98$) de los datos experimentales de los porcentajes de eliminación de radicales ABTS (y) por efecto de las distintas concentraciones de muestra (x). Empleando la regresión lineal, se obtuvo el valor de EC_{50} (Ecuación 10):

$$EC_{50} \text{ de eliminación de radiales ABTS} = \frac{50 - b}{m} \quad \text{Ecuación (10)}$$

Dónde:

b = El valor de la ordenada al origen de la curva obtenido mediante la regresión lineal.

m =El valor de la pendiente de la ecuación de la línea recta.

Potencia Antioxidante Reductora Férrica (FRAP)

La capacidad de las muestras para reducir el ion férrico (Fe^{3+}) se evaluó por el método de Benzie y Strain (1996), con modificaciones llevadas a cabo por Szóllósi y Vargas (2002). Se prepararon las siguientes soluciones: una solución amortiguadora de 300 mM acetato de sodio, pH 3.6; 10 mM TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) en 40 mM HCl y 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (el cual debe estar disuelto en agua grado HPLC). Con dichas soluciones se procedió a la preparación del reactivo FRAP, para ello se mezclaron 100 mL de la solución amortiguadora de acetatos con 10 mL de solución TPTZ y 10 mL de FeCl_3 . Posteriormente, el reactivo FRAP se incubó a 37°C durante 30 minutos antes de mezclar 1000 μL de dicho reactivo con 100 μL de muestra. La mezcla de reacción se dejó reposar en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 593 nm. Se empleó como estándar Trolox y como blanco se utilizó agua destilada.

Un aumento de la absorbancia de la mezcla de reacción con respecto a la concentración de muestras, indica el incremento del poder antioxidante de reducción férrica (Klomklao y Benjakul, 2018).

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos son reportados como la media \pm desviación estándar. La comparación entre dos variables fue realizada usando la prueba t- Student. Las variables dependientes (cuando se tenían más de tres variables independientes) para cada ensayo fueron analizados usando un ANOVA de una vía. Los datos en porcentaje fueron previamente transformados por $\arcsen(\sqrt{X})$. Se utilizó una prueba de comparación múltiple de Tukey

cuando se encontraron diferencias significativas entre las medias. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando se tenía un valor de $P < 0.05$. Para realizar el análisis estadístico y elaboración de los gráficos se empleó el software SigmaPlot 12.0.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Evaluación del Grado de Hidrólisis

Se obtuvieron hidrolizados proteicos del AC con distintos GH (5, 10, 15 y 20%) a diferentes tiempos (Figura 2) empleando la proteasa comercial Alcalasa®, usando la técnica potenciométrica del pH-stat, a una temperatura de 55 °C y un pH de 9.0.

La curva exhibió una velocidad de reacción rápida inicial obteniendo HP de AC con 5% de GH a los 0.45 ± 0 min y con 10% GH a los 2.6 ± 0.5 min; seguida por una disminución en la velocidad de la hidrólisis (15% GH a los 35.7 ± 3.5 min) hasta alcanzar un grado de hidrólisis de 20% a los 223 ± 25.2 min.

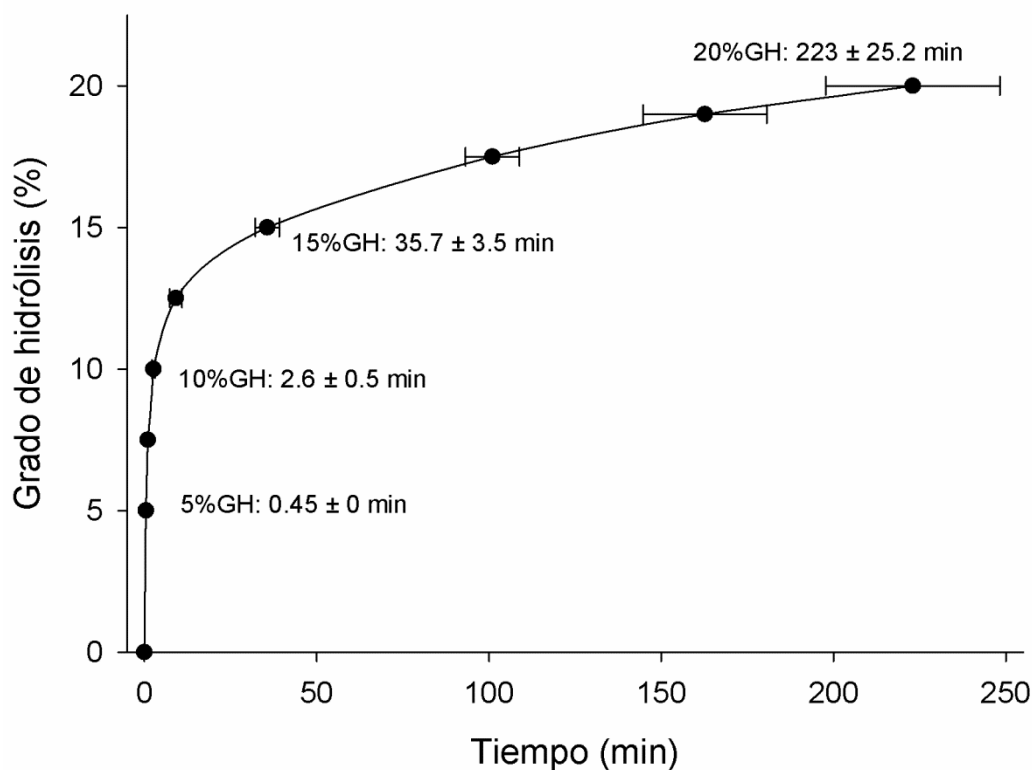


Figura 2. Monitoreo del grado de hidrólisis (GH) del agua de cola usando la enzima comercial Alcalasa® (relación E/S de 3%, a un pH de 9.0, a 55 °C). Las barras de error indican desviación estándar del tiempo al cual fue alcanzado el grado de hidrólisis deseado.

Caracterización Bioquímica del Agua de Cola e Hidrolizados Proteicos

Análisis Proximal del Agua de Cola y sus Hidrolizados Proteicos

El AC cruda de sardina crinuda (*Opisthonema libertate*) fue sometida a un proceso de centrifugación y los datos obtenidos del análisis proximal de estas muestras (humedad, proteína, lípidos y cenizas) se reportan en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis proximal del agua de cola cruda (AC) y agua de cola centrifugada (ACC). Los valores están expresados en % (medias \pm desviación estándar) de la masa húmeda total.

| Muestra | Humedad | Proteínas | Lípidos | Cenizas |
|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|
| AC | 91.9 \pm 0.0 | 5.9 \pm 0.6 | 1.1 \pm 0.1 | 1.8 \pm 0.0 |
| ACC | 92.6 \pm 0.0 | 5.1 \pm 1.0 | 0.6 \pm 0.1 | 1.8 \pm 0.0 |

También se realizó un análisis proximal a los liofilizados del AC centrifugada (LACC), así como a los diferentes HP con distintos GH (5, 10, 15 y 20%). Los valores obtenidos de este análisis se reportan en la Tabla 2.

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los niveles de proteína cruda en los HP con diferentes GH (5,10, 15 y 20%); sin embargo, se observó que los niveles de proteína (75.1 \pm 0.7% de la materia seca) y lípidos crudos (10.8 \pm 0.1% de la materia seca) de los liofilizados de ACC fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) con respecto al nivel proteico (56.6 – 59.9% de la materia seca) y lipídico (4.8 – 5.4% de la materia seca) registrado para los diferentes HP de agua de cola.

Tabla 2. Análisis proximal de liofilizados de agua de cola cruda (LAC), centrifugada (LACC) y de sus hidrolizados proteicos (HP). Los valores están expresados en % (medias \pm desviación estándar) de la masa seca total.

| Muestra | Humedad | Proteínas | Lípidos | Cenizas |
|----------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| LAC | 7.1* | 77.5 \pm 0.8 ^a | 13.9 \pm 0.1 ^a | 1.5 \pm 0.4 ^d |
| LACC | 13.5* | 75.1 \pm 0.7 ^a | 10.8 \pm 0.1 ^b | 0.6 \pm 0.1 ^e |
| HP 5% | 9.0 \pm 0.5 ^{bc} | 59.9 \pm 7.0 ^b | 5.4 \pm 0.8 ^c | 23.5 \pm 0.3 ^c |
| HP 10% | 11.3 \pm 1.0 ^a | 63.3 \pm 1.1 ^b | 4.9 \pm 0.5 ^c | 24.5 \pm 0.9 ^{bc} |
| HP 15% | 7.5 \pm 0.2 ^c | 57.7 \pm 1.8 ^b | 4.8 \pm 0.2 ^c | 26.2 \pm 1.2 ^{ab} |
| HP 20% | 10.1 \pm 1.6 ^{ab} | 56.6 \pm 2.5 ^b | 4.9 \pm 0.2 ^c | 26.4 \pm 0.9 ^a |

Los valores con distintos superíndices dentro de una misma columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

* Determinado por diferencia

Distribución de Pesos Moleculares de los Hidrolizados Proteicos

Mediante el análisis de distribución de pesos moleculares, se encontró que el 62.4 \pm 0.8% del total de péptidos presentes en los HP con 20% GH, poseían un peso molecular (PM) menor a 1.35 kDa. Se reportaron valores para el porcentaje de péptidos totales con pesos moleculares menores a 1.35 kDa de 48.2 \pm 1.2, 47.9 \pm 1.0, 47.3 \pm 1.0 % para los HP de 10, 15 y 5% GH respectivamente, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ellos, ni con el ACC (45.1 \pm 1.5 %). También se determinó que el porcentaje de los péptidos

totales del ACC (49.6 ± 1.0 %) se encuentran en el rango de pesos moleculares de 17-1.35 kDa. Asimismo, se determinó que el contenido de péptidos con PM de 17 -1.5 kDa sólo presenta diferencia significativa ($P < 0.05$) en el GH de 20% con respecto a los GH de 5, 10 y 15 % (Tabla 3).

Tabla 3. Distribución de pesos moleculares (% de los péptidos totales) del agua de cola centrifugada (ACC) y sus hidrolizados proteicos.

| PM (kDa) | ACC | Hidrolizados proteicos (% GH) | | | |
|-----------|------------------|-------------------------------|------------------|---------------------|------------------|
| | | 5% | 10% | 15% | 20% |
| >670 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.1 ± 0.6 |
| 670 - 158 | 0.5 ± 0.2 | 0.9 ± 0.3 | 1.2 ± 0.2 | 0.8 ± 0.1 | 1.1 ± 0.4 |
| 158 - 44 | 2.3 ± 0.1 | 2.1 ± 0.0 | 2.2 ± 0.0 | 2.2 ± 0.0 | 1.5 ± 0.1 |
| 44 - 17 | 2.4 ± 0.2 | 1.7 ± 0.1 | 1.7 ± 0.1 | 1.7 ± 0.0 | 1.0 ± 0.1 |
| 17 - 1.35 | 49.6 ± 1.0^a | 46.8 ± 1.8^{ab} | 46.7 ± 0.9^b | 47.2 ± 0.8^{ab} | 33.4 ± 0.3^c |
| <1.35 | 45.1 ± 1.5^b | 47.3 ± 1.0^b | 48.2 ± 1.2^b | 47.9 ± 1.0^b | 62.4 ± 0.8^a |

Los valores con distintos superíndices dentro de una misma fila son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Determinación del Contenido de Aminoácidos Presentes en el Agua de Cola e

Hidrolizados Proteicos

Los resultados obtenidos del perfil de aminoácidos (% del total de AA) presentes en el agua de cola centrifugada e hidrolizados proteicos a diferentes grados de hidrólisis se reportan

en la Tabla 4. Donde se puede apreciar que el porcentaje (%) de AAE (Aminoácidos esenciales, que el ser humano no sintetiza, sino que tiene que adquirir de la dieta) es mayor en los HP de 15%GH (47.8%) y el porcentaje (%) de AANE es mayor en los HP de 20% GH. También se puede apreciar que la mayoría de los aminoácidos que son de importancia para la capacidad antioxidante Val, Ser, Pro, His, Ala, Asp, Lys, Glu, Gly o Tyr (Jao y Ko, 2002), se encuentran en mayor porcentaje en los HP de 15% (Val: 3.9%; His: 11.1%; Asp: 8.4%; Lys: 8.5%; Gly: 11.8%; Tyr: 2.4%). Encontrándose también que His, un aminoácido que ha reportado capacidad antioxidante (Li *et al.*, 2007), se encuentra en una alta concentración (11.1%) en el HP con 15% GH, y que fue más alto con respecto a su contenido en otros hidrolizados.

La hidrólisis proteica del agua de cola analizada, no afectó el contenido de los aminoácidos (AAs) catiónicos Arg y Lys. Sin embargo, el contenido de His disminuyó significativamente ($P < 0.05$) conforme aumentó el grado de hidrólisis (GH). Un grado de hidrólisis de 5 y 10% aumentó significativamente ($P < 0.05$) el contenido de los aminoácidos aniónicos Asp y Glu, respecto a su contenido en el agua de cola no hidrolizada. Respecto a los aminoácidos azufrados, no se observaron diferencias significativas en el contenido de Met y Tau entre el ACC (2.8 y 6.5% de los AAs totales, respectivamente) y el hidrolizado proteico con 15% GH (2.9 y 5.6% de los AAs totales, respectivamente). Para los aminoácidos aromáticos, no hubo diferencia significativa en el contenido de Phe y Tyr entre el ACC y los hidrolizados con 15 y 20% GH.

Tabla 4. Perfil de aminoácidos (% del total de AA) en el agua de cola centrifugada (ACC) y sus hidrolizados proteicos (HP) a diferentes grados de hidrólisis (5, 10, 15 y 20%).

| AAs | ACC | Hidrolizados proteicos (% GH) | | | |
|-------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | HP5% | HP10% | HP15% | HP20% |
| Catiónicos | | | | | |
| Arg | 7.9 ± 1.3 ^B | 7.7 ± 0.4 | 8.1 ± 0.1 ^A | 6.9 ± 1.0 ^B | 7.8 ± 0.6 ^A |
| His | 15.0 ± 2.2 ^{a,A} | 6.7 ± 1.1 ^c | 3.7 ± 0.7 ^{d,B} | 11.1 ± 0.6 ^{b,A} | 2.4 ± 0.5 ^{d,B} |
| Lys | 9.5 ± 0.2 ^B | 8.6 ± 0.1 | 8.2 ± 0.2 ^A | 8.5 ± 0.5 ^B | 7.9 ± 0.0 ^A |
| Aniónicos | | | | | |
| Asp | 8.0 ± 0.5 ^{c,B} | 10.2 ± 0.6 ^{ab,B} | 10.5 ± 0.0 ^{a,B} | 8.4 ± 0.1 ^{bc,B} | 9.7 ± 0.2 ^{bc,B} |
| Glu | 14.5 ± 0.9 ^{c,A} | 17.8 ± 1.4 ^{a,A} | 19.3 ± 0.3 ^{a,A} | 14.1 ± 0.0 ^{c,A} | 17.1 ± 0.5 ^{b,A} |
| Azufrados | | | | | |
| Met | 2.8 ± 0.5 ^{a,B} | 1.4 ± 0.8 ^{bc,B} | 0.6 ± 0.1 ^{c,B} | 2.9 ± 0.1 ^{a,B} | 2.0 ± 0.4 ^{ab,B} |
| Tau | 6.5 ± 0.2 ^{a,A} | 4.7 ± 0.3 ^{bc,A} | 4.0 ± 0.1 ^{c,A} | 5.6 ± 0.2 ^{ab,A} | 4.4 ± 0.3 ^{c,A} |
| Aromáticos | | | | | |
| Phe | 2.4 ± 0.6 ^{ab} | 1.1 ± 0.9 ^{bc} | 0.3 ± 0.2 ^c | 2.9 ± 0.1 ^a | 1.7 ± 0.5 ^{abc} |
| Tyr | 2.1 ± 0.4 ^{ab} | 1.4 ± 0.4 ^{ab} | 0.9 ± 0.1 ^b | 2.4 ± 0.1 ^a | 1.5 ± 0.3 ^{ab} |
| Otros | | | | | |
| Ala | 8.1 ± 0.3 ^{b,B} | 10.1 ± 0.8 ^{a,B} | 11.5 ± 0.3 ^{a,B} | 8.4 ± 0.1 ^{b,B} | 11.3 ± 0.3 ^{a,B} |
| Gly | 13.4 ± 0.0 ^{c,A} | 15.7 ± 2.0 ^{b,A} | 19.6 ± 1.0 ^{a,A} | 11.8 ± 0.6 ^{d,A} | 18.6 ± 0.9 ^{a,A} |
| Ile | 1.8 ± 0.3 ^E | 1.7 ± 0.4 ^E | 1.4 ± 0.1 ^{EF} | 2.2 ± 0.1 ^D | 1.6 ± 0.2 ^F |
| Leu | 4.6 ± 0.5 ^C | 5.2 ± 0.0 ^C | 5.6 ± 0.1 ^C | 5.1 ± 0.0 ^C | 5.0 ± 0.0 ^C |
| Ser | 1.6 ± 0.1 ^{ab,E} | 0.6 ± 0.4 ^{ab,E} | 0.2 ± 0.1 ^{b,F} | 1.6 ± 0.7 ^{ab,D} | 1.8 ± 0.1 ^{EF} |
| Thr | 4.5 ± 0.2 ^{a,CD} | 3.5 ± 0.4 ^{ab,D} | 2.9 ± 0.1 ^{b,DE} | 4.3 ± 0.5 ^{ab,C} | 4.1 ± 0.1 ^{CD} |
| Val | 3.0 ± 0.4 ^{DE} | 3.5 ± 0.4 ^D | 3.2 ± 0.1 ^D | 3.9 ± 0.1 ^C | 3.3 ± 0.3 ^{DE} |
| ΣAAE | 51.5 | 39.4 | 34 | 47.8 | 35.8 |
| ΣAANE | 48.5 | 60.6 | 66 | 52.2 | 64.2 |

Valores dentro de las mismas columnas (mayúsculas) y filas (minúsculas) de cada grupo acuerdo al grupo funcional de los aminoácidos con diferente literal son significativamente diferentes ($P < 0.05$). AAE = aminoácidos esenciales; AANE = aminoácidos no esenciales.

Determinación de la Capacidad Antioxidante del Agua de Cola y sus Hidrolizados

Proteicos

Actividad de Inhibición del Radical DPPH

El efecto del grado de hidrólisis de los hidrolizados proteicos del AC de sardina crinuda sobre la actividad antioxidante determinada mediante inhibición de los radicales DPPH, se muestran en las Figuras 3 y 4. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), en el porcentaje de inhibición del radical DPPH y el valor de TEAC (Equivalentes Trolox de Actividad Antioxidante) del hidrolizado con 20% GH con respecto al resto de los HP (Figura 3). Por otra parte, se observó que la solubilidad de las proteínas presentes en las muestras fue limitada en el solvente de prueba (metanol) es limitada, de tal manera que para el ACC la máxima solubilidad en la solución de trabajo de DPPH fue de 5 mg/mL. Conforme aumentó el grado de hidrólisis, la solubilidad de la muestra en el solvente se incrementó, de tal forma que para un GH de 5% la máxima solubilidad fue de 15 mg/mL, para el GH 10% fue de 20 mg/mL, para los GH de 15% y 20%, el límite de solubilidad fue de 50 mg/mL. Por lo que para efectos de comparación de la actividad de eliminación de radicales DPPH entre muestras, en la Figura 3 sólo se presentan los valores alcanzados a la concentración de 5 mg/mL, lo que permite observar las diferencias en el potencial antioxidante (medido por la técnica de DPPH) asociado con el proceso de hidrólisis. Usando la concentración de 5 mg/mL, se observó que el hidrolizado de 20% GH exhibe el porcentaje de inhibición del radical DPPH más alto ($9.6 \pm 1.2\%$, equivalente a 1.2 ± 0.0 mg de Trolox/mg de HP respecto de los otros GH) (Figura 3A) con un EC_{50} de 43.25 ± 0.7 mg/mL (Figura 4), seguido de HP de 15%, 10% y 5% de GH con porcentajes de inhibición del 9.10, 8.4 y 7.7% equivalentes a 0.6, 0.5 y 0.3 mg de Trolox/mg de HP respectivamente (Figura 3A), con valores

estimados de EC_{50} para HP de 15%, 10% y 5% de GH de 46.23, 34.79 y 34.58 mg/mL, respectivamente (Figura 4).

Un hecho interesante a destacar es que en la estimación de EC_{50} no se observaron diferencias significativas entre los HP con GH de 15 y 20%, siendo mayores los valores estimados de EC_{50} respecto de los HP a GH de 10 y 5%, lo que resulta contrario al comportamiento a bajas concentraciones, ya que esta estimación indicaría una menor efectividad a GH elevados (Figura 4), por lo que para este estudio, esta prueba no es totalmente determinante para establecer la actividad antioxidante en los HP probados.

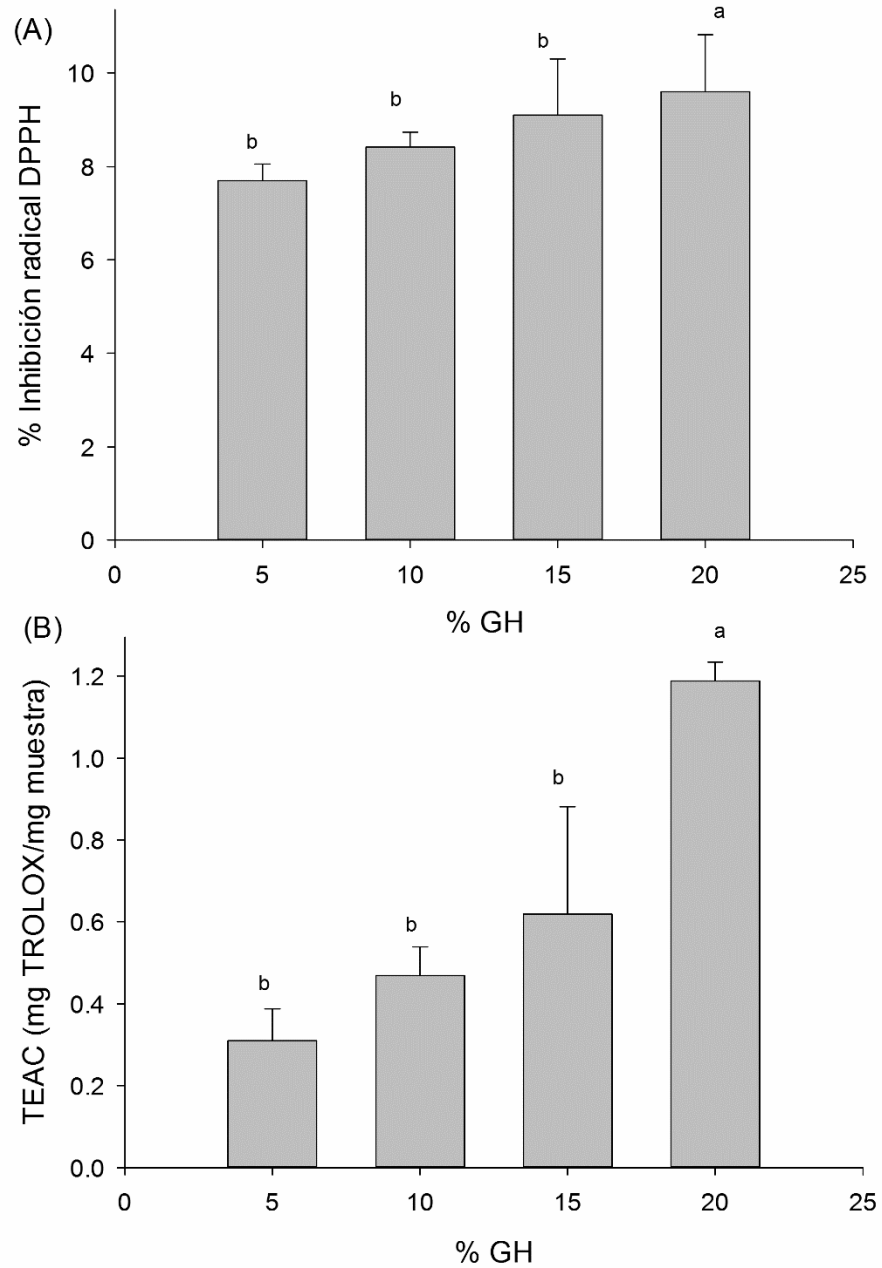


Figura 3. Efecto del grado de hidrólisis (GH) de los hidrolizados proteicos de AC de sardina crinuda a una concentración de 5 mg/mL, sobre el porcentaje de inhibición o eliminación del radical DPPH. Actividad expresada como (A) porcentaje de inhibición y (B) Trolox equivalentes (TEAC). Las barras de error indican desviación estándar de los datos. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

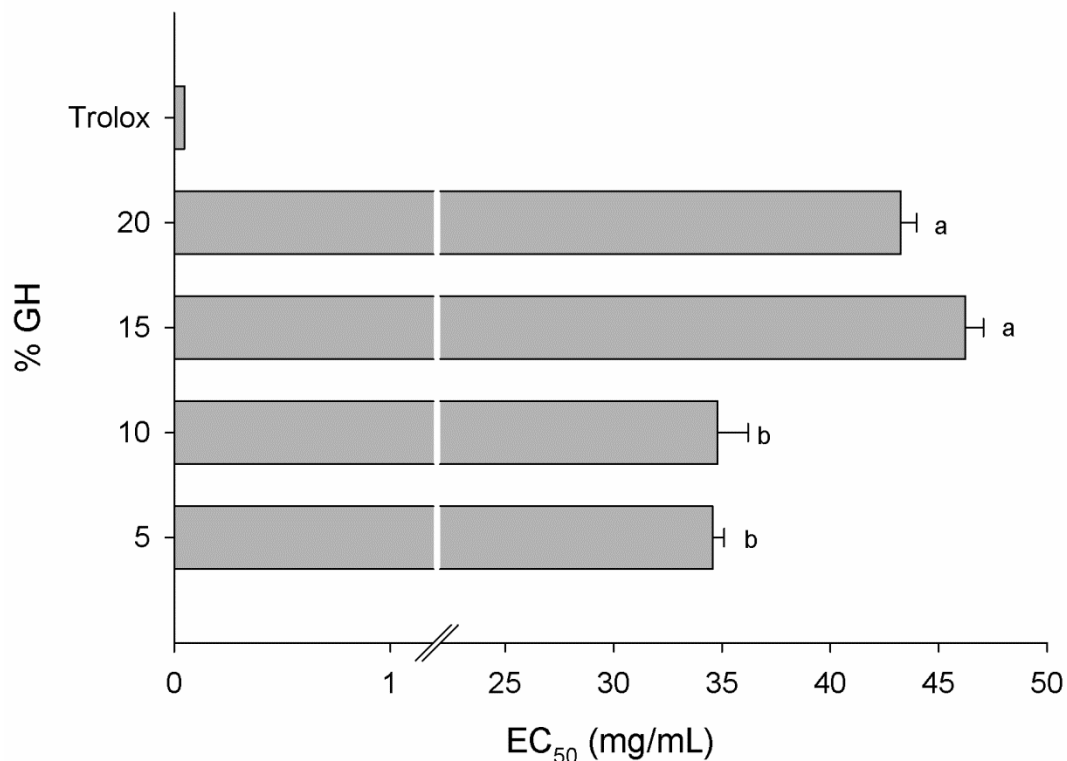


Figura 4. Concentración media efectiva (EC₅₀) en mg/mL de los HP a distintos GH, estimada mediante la eliminación del 50% de los radicales DPPH presentes en la solución. Los valores con distintas letras indica diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos. Las barras de error indican desviación estándar de los datos. Se muestra el EC₅₀ del estándar Trolox para efectos de comparación.

Reducción del Radical ABTS

El efecto de la concentración de los HP de AC de sardina crinuda a distintos grados de hidrólisis sobre el porcentaje de reducción del radical ABTS, se muestra en la Figura 5; como puede observarse existe también una efectividad dependiente de la concentración del HP utilizado en la prueba. Los HP con 15% de GH, exhibieron el mayor porcentaje de inhibición

del radical ABTS a todas las concentraciones probadas (0.5 - 5.0 mg/mL), logrando alcanzar un porcentaje máximo de reducción del radical ABTS de 78.8%, seguido por el HP de 10% y 20% de GH con un 71.3% y 65.4%, respectivamente (Figura 5).

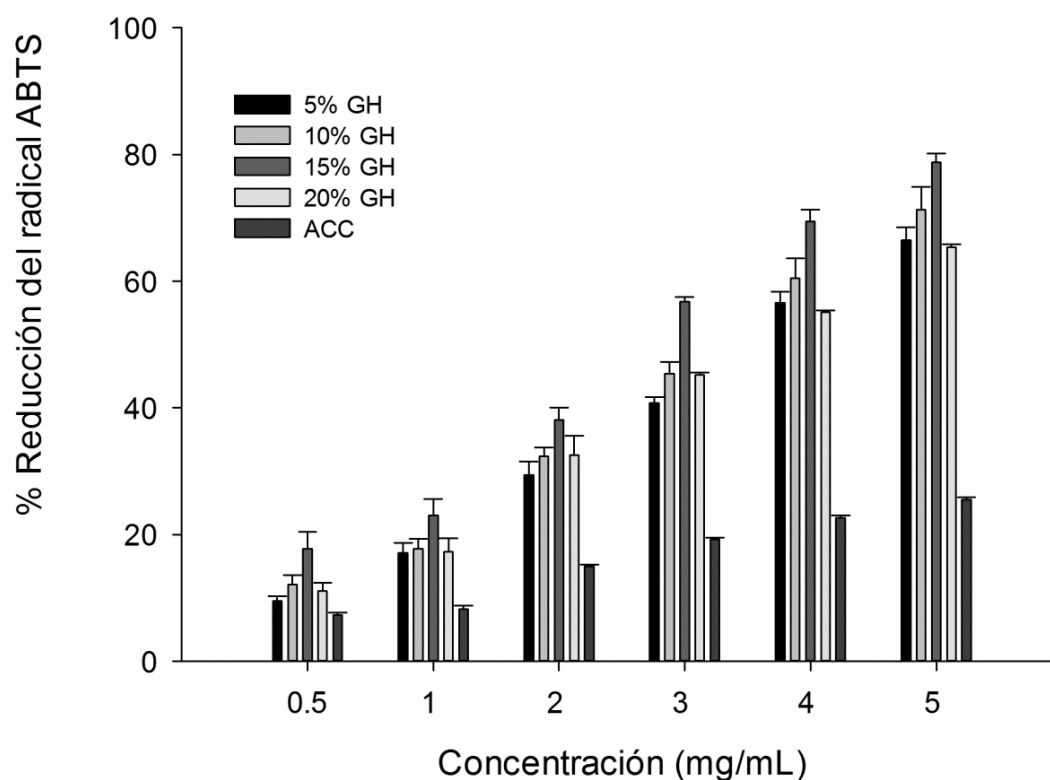


Figura 5. Efecto de la concentración de agua de cola centrifugada (ACC) y de sus hidrolizados a distintos grados de hidrólisis (GH) sobre el porcentaje de reducción del radical ABTS. Las barras de error indican la desviación estándar de los datos.

Respecto de la estimación de la EC_{50} para los diferentes GH mostrados en la Figura 6, se obtuvo el menor valor de EC_{50} (2.8 mg/mL) para el HP a 15% de GH. Los HP de ACC de

5, 10 y 20 % de GH obtuvieron un EC_{50} de 3.6, 3.3 y 3.6 mg/mL, respectivamente. El ACC obtuvo un EC_{50} de 10.8 mg/mL.

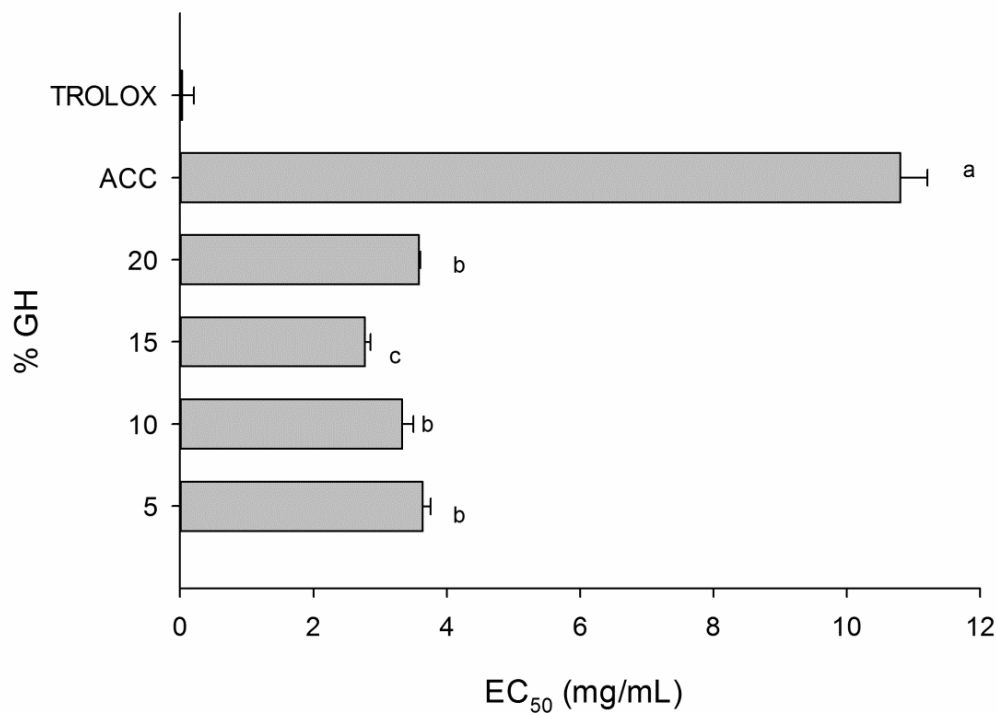


Figura 6. Concentración media efectiva (EC_{50}) en mg/mL del ACC y sus HP a distintos GH, determinada mediante la eliminación del 50% de los radicales ABTS presentes en la solución de prueba. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ($P < 0.05$). Se muestra el EC_{50} del estándar Trolox para efectos de comparación. Las barras de error indican desviación estándar de los datos.

En la Figura 7 se muestra los valores en Trolox equivalentes de actividad antioxidante (TEAC = mg de Trolox equivalentes/mg de muestra) medidos mediante la reducción del radical ABTS a diferentes grados de hidrólisis, a una concentración de 5 mg/mL. El HP a 15%

GH exhibió el valor más alto con un TEAC de 9.92 mg de Trolox/mg de HP. Para los hidrolizados con GH de 5, 10 y 20%, los valores de TEAC fueron 3.6, 3.3 y 3.6 mg de Trolox/mg de HP, respectivamente. Para el agua de cola sin hidrolizar (ACC) se obtuvo un TEAC de 10.8 mg de Trolox/mg de ACC. Existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en los valores reportados de TEAC para los HP de 15% comparado con el resto de las muestras (HP de 20, 10 y 5 % GH) y el AC sin hidrolizar (Figura 7).

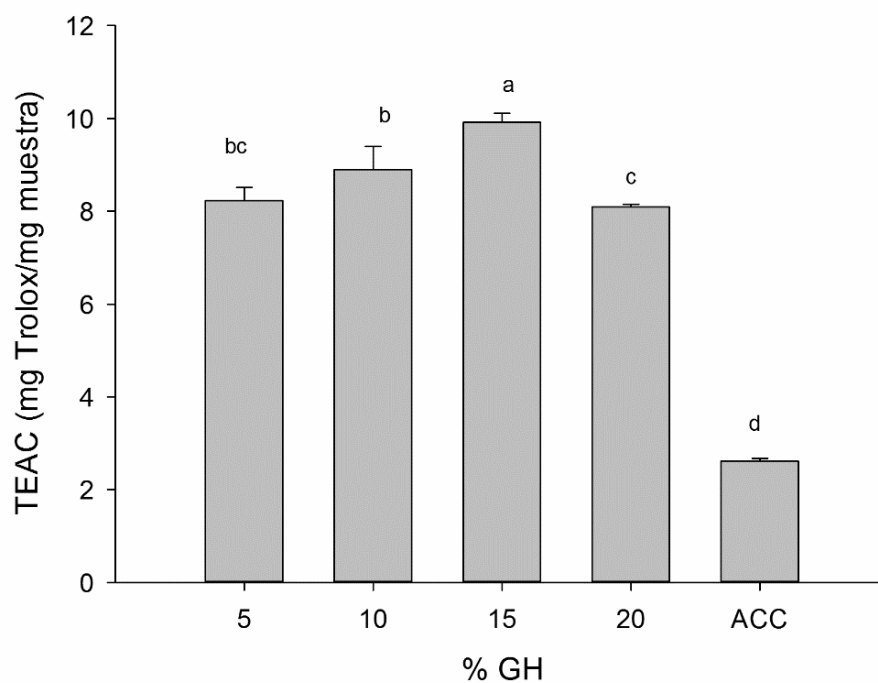


Figura 7. Efecto del grado de hidrólisis de los HP de AC de sardina crinuda sobre la actividad antioxidante reportada en equivalentes Trolox, medida por la reducción del radical ABTS a una concentración de la muestra de 5 mg/mL. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ($P < 0.05$). Las barras de error indican desviación estándar de los datos.

Potencia Antioxidante Reductora Férrica (FRAP)

Para determinar el posible cambio en la potencia antioxidante reductora férrica que se logra con el proceso de hidrólisis, se probaron a distintas concentraciones el ACC y sus distintos HP (Figura 8). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en la actividad reductora férrica entre los HP de ACC de sardina crinuda (*Opisthonema libertate*). Se observó una mayor potencia reductora férrica en el hidrolizado de 15% GH con respecto a la registrada con los HP de 20, 10 y 5% GH. Los resultados obtenidos muestran que al aumentar la concentración de los HP aumenta la absorbancia y con ello la capacidad de reducir al ión Fe^{+3} a Fe^{+2} . Además, se observa que el HP con 15% GH presenta la mayor potencia reductora férrica en la concentración máxima utilizada que fue de 50 mg/mL. También se observó que el HP de 5% GH presenta una potencia reductora férrica elevada a concentraciones menores de 30 mg/mL. Sin embargo, cuando se aumenta la concentración, la potencia reductora férrica tiende a disminuir (Figura 8).

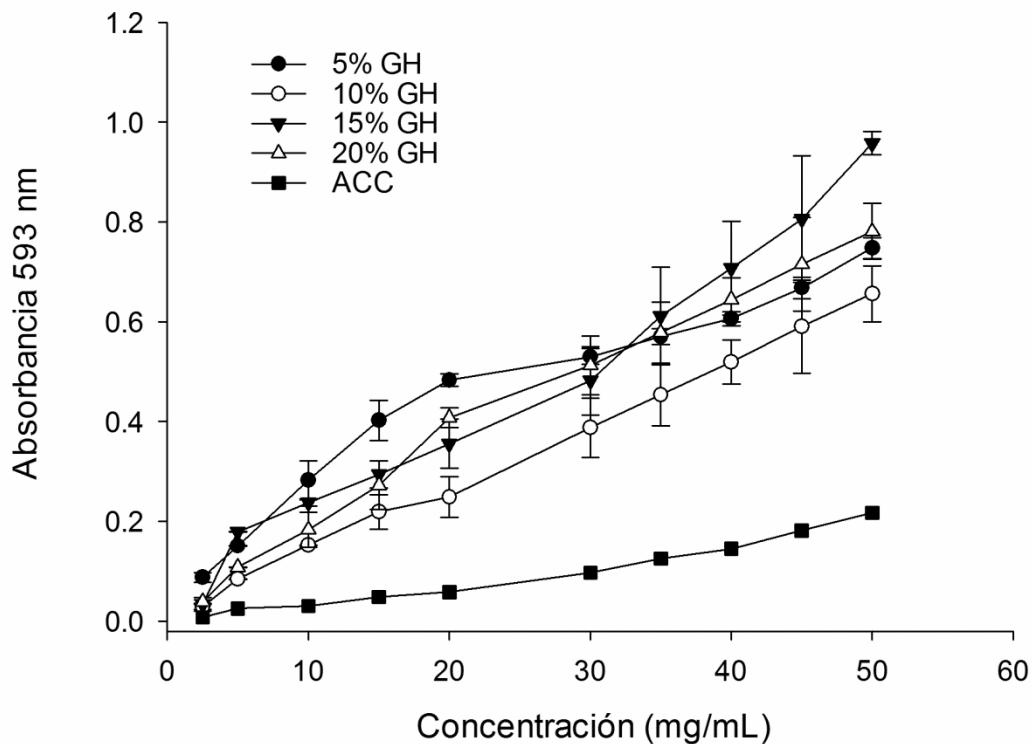


Figura 8. Efecto del grado de hidrólisis (GH) de hidrolizados proteicos de agua de cola de sardina crinuda y su concentración sobre la potencia reductora férrica (FRAP). Las barras de error indican desviación estándar de los datos.

En la Figura 9 se muestran los equivalentes Trolox (mg de Trolox/mg de muestra) para reportar la actividad antioxidante mediante la potencia reductora férrica (FRAP) de los hidrolizados proteicos con diferentes grados de hidrólisis, a una concentración de 5 mg/mL. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los valores de TEAC para los HP, observándose valores significativamente más altos de TEAC para el HP con 15% de GH (340.2 mg de Trolox/mg de HP) respecto de los HP con 5, 10 y 20 % de GH, cuyos valores de TEAC fueron de 262.4, 142.7 y 77 mg de Trolox/mg de HP, respectivamente.

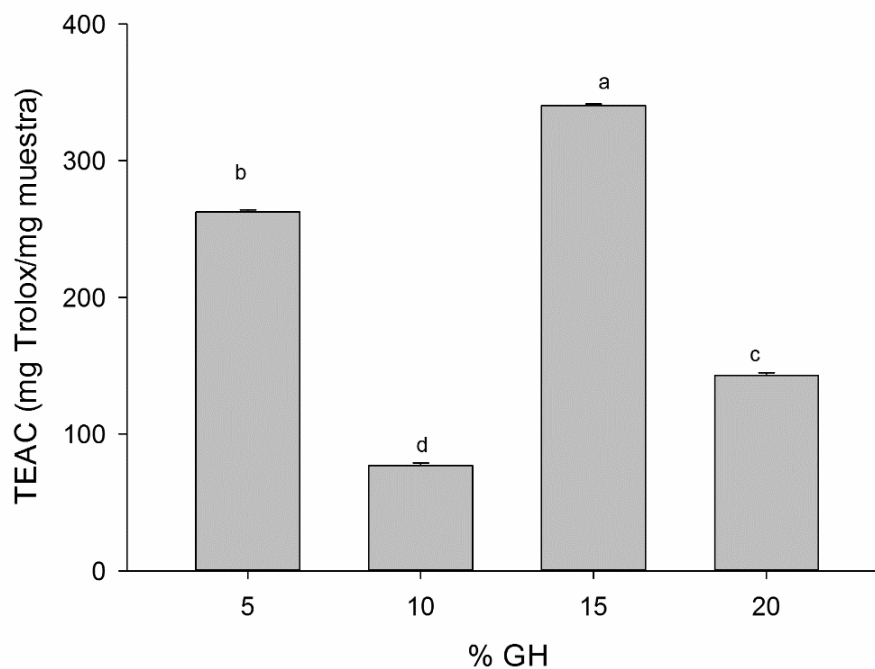


Figura 9. Efecto del grado de hidrólisis de los HP de AC de sardina crinuda sobre la potencia reductora férrica (FRAP) expresada en equivalentes Trolox, para las muestras a una concentración de 5 mg/mL. Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Debido que los métodos utilizados para determinar la capacidad antioxidante proporcionan comportamientos distintos que dificultan la comparación, en la mayoría de los estudios en los que se evalúa la actividad antioxidante, se utiliza como sustancia patrón el antioxidante sintético Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). Así, podemos comparar la actividad antioxidante exhibida por una cantidad fija de muestra entre métodos de análisis (en este caso 1 mg de muestra seca), si expresamos dicha actividad en unidades equivalentes del compuesto estándar (TEAC, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*).

Por lo anterior, se realizó la comparación de la actividad antioxidante mediante las técnicas de inhibición del radical DPPH, inhibición del radical ABTS y la potencia antioxidante férrica (FRAP) a una misma concentración del hidrolizado (5 mg/mL), observándose que el HP de 15% GH reporta los valores más altos de actividad antioxidante expresados en TEAC (mg de Trolox/ mg de muestra) mediante los ensayos de ABTS y FRAP, con respecto a los otros GH (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de las técnicas DPPH, ABTS y FRAP a una misma concentración (5 mg/mL), expresado en equivalentes de Trolox (TEAC) del agua de cola centrifugada (ACC) y sus hidrolizados proteicos (HP) a distintos grados de hidrólisis.

| Muestra | Actividad antioxidante (TEAC) (mg de Trolox/ mg de muestra) | | |
|-----------|--|-------------------------|--------------------------|
| | DPPH | ABTS | FRAP |
| ACC | N.D. | 2.6 ± 0.0 ^d | N.D. |
| HP 5% GH | 0.3 ± 0.1 ^b | 8.2 ± 0.3 ^{bc} | 262.4 ± 1.6 ^b |
| HP 10% GH | 0.5 ± 0.1 ^b | 8.9 ± 0.5 ^b | 77.0 ± 1.9 ^d |
| HP 15% GH | 0.6 ± 0.3 ^b | 9.9 ± 0.2 ^a | 340.2 ± 1.4 ^a |
| HP 20% GH | 1.2 ± 0.0 ^a | 8.1 ± 0.1 ^c | 142.7 ± 1.9 ^c |

N.D.: No se detectó actividad.

Los valores con distintas letras son significativamente diferentes ($P < 0.05$) para una misma columna.

CAPÍTULO IV

DISCUSIONES

Evaluación del Grado de Hidrólisis

El GH es una medida del grado de escisión y es el indicador más utilizado para observar el efecto de enzimas sobre alguna proteína (Nielsen *et al.*, 2001). En el presente trabajo, se obtuvieron distintos GH a diferentes tiempos usando Alcalasa®, a una temperatura de 55 °C y un pH de 9. Las características que poseen los hidrolizados, dependen de la enzima, o mezcla de estas, que se utilice, el grado de hidrólisis y las condiciones físicas y químicas en las que se desarrolle la reacción (pH, temperatura, tiempo de reacción) (Dzwolak y Ziajka, 1999). El proceso de hidrólisis fue monitoreado (Figura 2) para determinar en tiempo real el momento en el que se alcanzaba el grado de hidrólisis (GH) deseado y poder detener la reacción inmediatamente. Para este caso, dicha curva reveló que al inicio de la reacción, la velocidad de hidrólisis proteica procede con rapidez logrando alcanzar un GH del 5 y 10% en menos de tres minutos (0.45 y 2.6 min, respectivamente) y posteriormente la velocidad disminuye hasta alcanzar casi un estado estacionario (valores de GH 15 y 20% que se alcanzaron a los 35.7 y 223 min, respectivamente). Este comportamiento de reducción en la tasa de hidrólisis con respecto al tiempo de reacción, pudiera asociarse a que la actividad enzimática, conforme transcurre el tiempo de reacción, se ve influida negativamente por la formación de los productos que se están generando los cuales pueden influir en los mecanismos catalíticos de la enzima; pero también, la disminución de la velocidad de hidrólisis puede deberse a la reducción en la concentración del sustrato disponible para que se lleve a cabo la reacción enzimática (Guerard *et al.*, 2002). Entender el comportamiento de la hidrólisis enzimática a través del monitoreo de la reacción, permite seleccionar el momento en el que se debe detener la reacción enzimática cuando se elaboran HP dependiendo del grado de hidrólisis de interés, ya que, la actividad biológica de los mismos depende no sólo del tipo

y/o fuente de la proteína, enzima y condiciones físicas y químicas de hidrólisis, sino que se ha observado que el GH alcanzado tienen una gran influencia en tamaño y propiedades bioactivas del tipo antioxidante, funcionales y organolépticas de los péptidos generados (Bougatef *et al.*, 2010).

Son pocos los estudios que se han enfocado en hidrolizar la proteína presente en efluentes pesqueros (subproductos líquidos), en contraste a los reportes de hidrolizados proteicos usando subproductos sólidos pesqueros los cuales son vastos. Por ejemplo, Jao y Ko (2002) obtuvieron hidrolizados proteicos a partir de agua de cocción de atún utilizando una proteasa XXIII derivada de *Aspergillus oryzae*. Estos autores reportaron la producción de hidrolizados con grados de hidrólisis de hasta del 30%, en un tiempo de 360 minutos y los cuales mostraban propiedades antioxidantes. En un estudio más reciente, Hung *et al.*, (2014) utilizaron una proteasa XXIII (con actividad específica de 3.8 unidades/mg sólido), la cual era una endopeptidasa preparada a partir de *Aspergillus melleus* para hidrolizar agua de cocción de atún (*Thunnus tonggol*), quienes observaron que el grado de hidrólisis se incrementa rápidamente durante las primeras dos horas del proceso y donde el GH más alto alcanzado fue de 14%, después de 6 horas de hidrólisis proteica. Asimismo, Hsu *et al.*, (2009) evaluaron la hidrólisis del agua de cocción de músculo oscuro de atún (*Thunnus tonggol*), con orientasa 90 N, la cual es una endopeptidasa obtenida a partir de *Bacillus subtilis* (con actividad específica de 70, 000 unidades / mg de sólido), observando una velocidad alta de hidrólisis durante los primeros 30 minutos (alcanzando 15% GH en este tiempo) y luego una disminución hasta obtener un GH poco más de 30% a los 360 min, lo que indicó que se produjo una escisión máxima de los péptidos dentro de los 30 minutos posteriores a la hidrólisis. Por lo que la información aquí generada del comportamiento de la hidrólisis proteica con Alcalasa® para producir HP a distintos GH empleando como fuente proteica el AC de sardina crinuda, resulta

relevante para el aprovechamiento de este subproducto, permitiendo establecer las condiciones para producir un HP bioactivo.

Caracterización Bioquímica del Agua de Cola e Hidrolizados Proteicos

Análisis Proximal

Con respecto a la composición proximal de la materia prima empleada para la producción de HP, las variaciones en el contenido proteico y lipídico, principalmente, respecto al reportado para efluentes líquidos similares reportados por otros autores, se asocia con las variaciones interespecíficas del contenido nutricional de las sardinas y distintas especies de pelágicos menores empleadas para la obtención de harina de pescado y cuya naturaleza es variable. Por lo que, tanto la composición de la harina de pescado, así como del AC generada durante su producción varía dependiendo de la especie pelágica utilizada, época de captura y condiciones fisiológicas (Bandarra *et al.*, 1997; Bechtel, 2005). Así, se han reportado valores de 3% de proteína, 1.4% de cenizas y 0.1% de lípidos para agua de cola centrifugada (ACC) de varias especies de pelágicos como la sardina Monterey (*Sardinops sagax caerulea*), la anchoveta de California (*Engraulis mordax*), la anchoveta del Pacífico (*Cetengraulis mysticetus*) y caballa (*Scomber japonicus*), cuyas mezclas se usan comúnmente en la industria reductora para producir harinas de pescado (García-Sifuentes *et al.*, 2014). Lo anterior coincide con lo reportado en el presente estudio donde se encontró un porcentaje de proteína de 5.1%, 0.6% de lípidos y 1.8% de cenizas. El valor de lípidos es menor debido al proceso de centrifugación al que fue sometida la muestra de agua centrifugada cruda y que son removidos en parte tras este proceso (Goycolea, 1997).

Se ha reportado un contenido de proteína cruda en el AC de 70 a 86% (en base seca) en distintos efluentes generados en la industria pesquera de especies tales como el abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*) y salmón (*Oncorhynchus sp*) (Bechtel, 2005; Sathivel *et al.*, 2005), dichos niveles de proteína son similares a los registrados en el agua de cola usada en la presente investigación (77.5% de la materia seca total).

Generalmente, los HP son empleados como ingredientes alimentarios, por lo que la composición química de un ingrediente o alimento tiene un papel importante en la salud humana por el suministro de nutrientes esenciales que permitan mantener una salud próspera, por lo que la composición química de los HP de pescado es importante desde la perspectiva de nutrición y salud humana y animal.

En el caso del contenido de proteína en los HP generados a partir de AC de sardina crinuda (59.9, 63.3, 57.7 y 56.6% para HP con 5, 10, 15, y 20% GH respectivamente), los resultados obtenidos fueron superiores a lo reportado por Pérez-Santín *et al.*, (2013) quienes trabajaron con concentrados de agua de cocción de camarón (*Penaeus spp.*) obteniendo valores de 26.2 (aproximadamente 53% de la materia seca total), 9.5 y 10.8 g/L para proteína, lípidos y cenizas, respectivamente. Asimismo, Nilsang *et al.* (2005), obtuvieron HP generados a partir de concentrados solubles de pescado usando proteasas comerciales (Flavourzyme™ y Kojizyme™) reportando valores de 66.40, 2.37, 25.94% para proteína, lípidos y cenizas, respectivamente. En este sentido, el contenido de proteína de los hidrolizados de agua de cola de sardina, se encuentran en el rango antes mencionado, por lo que estos podrían ser potencialmente aplicados como suplementos alimentarios, ya sea para humanos o animales tanto terrestres o acuáticos. El alto contenido de proteína cruda reportado para HP de pescado, se debe primeramente a la solubilización de proteínas durante la hidrólisis y a la posterior

eliminación de materia sólida insoluble por centrifugación (Chalamaiah *et al.*, 2010). Lo que se observa en nuestro estudio con valores de 59.9% a 63.3% de proteína cruda total, al incrementar el GH de 5% a 10%. Asimismo, el contenido de lípidos disminuyó de 5.4 a 4.9% en los HP de 5 y 10% respectivamente. Con respecto al contenido de lípidos, diversos autores han señalado valores promedio de 5% (Thiansilakul *et al.*, 2007; Wasswa *et al.*, 2007; Pacheco-Aguilar *et al.*, 2008; Ovissipour *et al.*, 2009) o ligeramente mayores (Sathivel *et al.*, 2005; Souissi *et al.*, 2007; Chalamaiah *et al.*, 2010). Estos valores, concuerdan con lo obtenido en este estudio, ya que para el caso de los HP de AC de sardina crinuda, el porcentaje de lípidos fluctuó entre 4.8 y 5.4% de la materia seca total en los hidrolizados proteicos con distintos grados de hidrólisis. (Tabla 2). En productos derivados de organismos marinos, existe una ligera variación del contenido de grasa asociada con la especie y la época de captura, observándose niveles mayores de lípidos en épocas invernales respecto a las registradas durante el verano para una misma especie (Rosa *et al.*, 2003). En el caso de los HP de pescado, se observa una disminución del contenido lipídico tras un proceso de centrifugación como fue el caso del presente estudio, en el cual se eliminaron lípidos tanto unidos a fracciones de proteína insoluble así como a lípidos que se concentran en una capa superior semi-sólida tras el proceso de centrifugación y la cual puede ser fácilmente removida (Chalamaiah *et al.*, 2012), es por ello, que en los HP se observan menores contenidos de lípidos que en el AC empleada para obtenerlos (Tabla 1 y 2).

En promedio se han reportado contenidos de cenizas muy variables en HP obtenidos a partir de desechos sólidos de peces, cuyos valores van del 0.45 al 27% de la materia seca total (Chalamaiah *et al.*, 2010; Mazorra-Manzano *et al.*, 2011). En el presente estudio se encontró que el contenido de cenizas para los HP de AC de sardina crinuda fue elevado (23.5, 24.5, 26.2, 26.4% para los GH de 5, 10, 15 y 20% respectivamente), respecto a los niveles de ceniza

registrado al agua de cola centrifugada previo al proceso de hidrólisis (0.6% de la materia seca total). Estos valores se atribuyen al uso de la base (NaOH) añadida para el ajuste del pH del medio, empleado durante el proceso de hidrólisis enzimática (Choi *et al.*, 2009; Pacheco-Aguilar *et al.*, 2008) y que generan sales que difícilmente pueden ser eliminadas del producto final mediante el proceso de centrifugación. Es por ello que conforme se incrementa el GH en los hidrolizados proteicos, se incrementa la adición de base, y por tanto, el contenido de cenizas es mayor. En términos generales, el incremento de cenizas en los hidrolizados proteicos puede afectar las propiedades fisicoquímicas y funcionales del HP como la viscosidad y solubilidad (Choi *et al.*, 2009). Por lo que se recomienda, para futuras investigaciones, evaluar distintas técnicas para remover sales de los hidrolizados proteicos o en su caso, usar otras metodologías para cuantificar el grado de hidrólisis durante el proceso y que no impliquen el uso de soluciones salinas.

Distribución de Pesos Moleculares

Mediante hidrólisis enzimática de proteínas se generan péptidos de diferentes pesos moleculares y secuencias peptídicas; estas variaciones están influenciadas por la fuente de proteína empleada y la especificidad de la enzima utilizada para la escisión (Klompong *et al.*, 2007). Así, un aspecto relevante que se relaciona con la bioactividad que presentan los HP son las características moleculares de estos compuestos. Por ejemplo, en lo concerniente a la actividad antioxidante se ha observado que factores como el peso molecular, tipo y secuencia de aminoácidos en los HP influyen en la misma (Zhou *et al.*, 2012). Investigaciones previas indican que los péptidos con menor masa molecular pueden mostrar mayor actividad antioxidante en comparación con las proteínas originales (Elias *et al.*, 2008), posiblemente debido a una mayor accesibilidad de la cadena lateral funcional (grupo R) a las especies

reactivas y los enlaces peptídicos densos en electrones. A su vez, estudios previos han indicado que algunos aminoácidos pueden ser más antioxidantes que sus péptidos originales (Erdmann *et al.*, 2008; Kitts y Weiler, 2003). Sin embargo, no importa que tan grande o pequeño sea el péptido/polipéptido, sino el tipo de aminoácidos, y su cantidad, que conforman la secuencia peptídica. Ejemplo de ello es el estudio reportado por Wu *et al.* (2003), quienes encontraron que una fracción peptídica de aproximadamente 1.4 kDa obtenida a partir de un hidrolizado de macarela (*Scomber austriasicus*), presentó una actividad antioxidante *in vitro* más fuerte que aquellas fracciones peptídicas con pesos moleculares entre 200-900 Da.

La mayoría de los péptidos con capacidad antioxidante muestran pesos moleculares de alrededor de 1 kDa (Wu *et al.*, 2015). Lo anterior coincide con la distribución del peso moleculares de los péptidos obtenidos en este estudio, pues se observó que en los HP elaborados a partir de AC de sardina crinuda, los péptidos con pesos moleculares menores a 1.35 kDa, representaban el 47.3, 48.2, 47.9 y 62.4% de los péptidos totales para HP con grados de hidrólisis de 5, 10, 15 y 20%, respectivamente. Por su parte, los péptidos con pesos moleculares en un intervalo de 1.35 a 17 kDa representó el mayor porcentaje de péptidos totales (47.2%) para el HP de 15% GH, y de 46.8, 46.7 y 33.4% para los HP de 5, 10 y 20% GH, respectivamente (Tabla 3). También es posible observar que, para el agua de cola de sardina, el 49.6 y 45% de los péptidos totales poseen pesos moleculares en los rangos de 1.35 a 17 kDa y menores a 1.35 kDa, respectivamente (Tabla 3). Este resultado es interesante, ya que se aprecia que el agua de cola de sardina crinuda *per se*, contiene péptidos de bajo peso molecular, lo cual puede estar relacionado con el proceso de obtención de harina de pescado, en el cual se utilizan temperaturas elevadas que pudieran causar una degradación proteica y la consecuente generación de péptidos y aminoácidos libres. Por otra parte, las muestras con un

grado de hidrólisis del 20%, presentaron la mayor concentración ($P < 0.05$) de péptidos con pesos moleculares menores a 1.35 kDa, indicando así el efecto de la hidrólisis enzimática sobre el peso molecular de los péptidos en los hidrolizados proteicos (Tabla 3). El peso molecular de los péptidos presentes en los hidrolizados de agua de cola de sardina, concuerdan con lo reportado en otras investigaciones que han realizado hidrólisis enzimática y un posterior aislamiento de péptidos de efluentes pesqueros. A manera de ejemplo, Hsu *et al.*, (2009) aislaron con cromatografía de exclusión molecular, tres péptidos obtenidos de la hidrólisis con la enzima orientasa (nombre comercial de una proteasa producida por *Aspergillus niger*) de agua de cocción de atún (*Thunnus tonggol*) con pesos moleculares de 1.305, 0.938 y 0.584 kDa. En otro estudio, se hidrolizó también agua de cocción de atún (*Thunnus tonggol*) con la endopeptidasa XXII preparada de *Aspergillus melleus*, y tras un proceso de ultrafiltración de los hidrolizados se identificaron dos péptidos de 2449.292 Da y 2562.405 Da, los cuales poseían propiedades antiproliferativas en contra de líneas celulares de cáncer de seno humano (Hung *et al.*, 2014).

Determinación del Contenido de Aminoácidos

La cantidad y tipo de aminoácidos presentes en los hidrolizados de proteína, juegan un papel determinante en su actividad biológica y valor nutricional. La hidrólisis proteica del agua de cola de sardina crinuda (*Opisthonema libertate*), no afectó el contenido de los aminoácidos (AAs) catiónicos Arg y Lys, ambos siendo esenciales e involucrados en distintos procesos del metabolismo proteico; sin embargo, el contenido de His disminuyó significativamente conforme aumentó el grado de grado de hidrólisis (GH). Un grado de hidrólisis de 5 y 10% aumentó significativamente ($P < 0.05$) el contenido de los aminoácidos

aniónicos Asp y Glu, respecto a su contenido en el agua de cola. Respecto al agua de cola y su hidrolizado al 15% de GH, estos mostraron los contenidos más altos de AAs azufrados (Met y Tau) y aromáticos (Phe y Tyr) (Tabla 4). Este comportamiento es interesante, ya que la presencia de estos aminoácidos se relaciona con la capacidad antioxidante de hidrolizados de proteína (Udenigwe y Aluko, 2011). Resultados similares, fueron los encontrados por Nilsang *et al.* (2005), quienes reportaron que, al obtener hidrolizados a partir de un concentrado de solubles de pescado, la cantidad de Asp, Glu, Met, Phe y Tyr, aumentó después de la hidrólisis enzimática. De acuerdo a estos autores, la composición de aminoácidos totales después de la hidrólisis cambia con respecto al contenido de aminoácidos en el sustrato debido a que, durante el proceso hidrolítico, son eliminadas tanto sustancias de origen no proteico, así como proteínas de baja digestibilidad y que al no ser totalmente hidrolizadas son removidas durante el proceso de centrifugación.

Pérez-Santín *et al.* (2013), reportaron el predominio de aminoácidos tales como Gly, Pro, Glu, Asp y Arg en péptidos de bajo peso molecular (1335 – 502 Da) obtenidos a partir de agua de cocción de camarón (*Penaeus spp*), péptidos que poseían propiedades antioxidantes y antihipertensivas. Lo anterior concuerda con el perfil de aminoácidos reportado en el presente estudio, donde se observaron valores en porcentaje de 14.1, 11.8, 8.4% para Glu, Gly y Asp, respectivamente (Tabla 4); dichos valores corresponden a los HP con un GH de 15%, siendo dicho hidrolizado el que exhibió la mayor actividad antioxidante mediante las técnicas de inhibición del radical ABTS y potencia reductora férrica (FRAP) (Tabla 5). En este sentido, Chean *et al.*, (2017) explican que la composición, estructura e hidrofobicidad de los aminoácidos que componen a los péptidos se encuentra relacionada a la capacidad antioxidante de los mismos. En este sentido, aminoácidos como Tyr, Trp, Met, Lys, Cys e His,

son ejemplos de aminoácidos que le confieren actividad antioxidante a los hidrolizados de proteína (Wang *et al.*, 2006). Por ejemplo, se ha reportado que la actividad antioxidante de los péptidos que contienen His está relacionada con la donación de hidrógenos, (Li *et al.*, 2007) el atrapamiento de radical peróxido y la capacidad de quelación de iones metálicos del grupo imidazol (Niranjan *et al.*, 2005; Je *et al.*, 2007).

Taheri *et al.* (2013), trabajando con proteínas obtenidas a partir de salmuera de arenque (*Clupea harengus*) reportaron que los aminoácidos libres predominantes en la fracción de 50-10 kDa fueron Arg, Lys y Ala, los cuales constituyeron aproximadamente el 12.4, 11.5, 11.4% del total de los aminoácidos libres, respectivamente. En el presente estudio, en el HP con 15% GH se observaron valores de 6.9, 8.5 y 8.4% para Arg, Lys y Ala, respectivamente, siendo este HP el que exhibieron la mayor actividad antioxidante *in vitro* (Tabla 5).

De forma interesante, el agua de cola de sardina crinuda analizada en este estudio, presentó un 51.5 % de aminoácidos esenciales (AAE), indicando así que este efluente es una fuente adecuada de este tipo de compuestos de importancia nutricional. Asimismo, el hidrolizado con un GH del 10 %, presentó el menor contenido de AAE (34% del total de AA), mientras que el mayor contenido de AAE (47.8% del total de AA) lo exhibió el hidrolizado con un 15% de GH (Tabla 4).

Determinación de la Capacidad Antioxidante del Agua de Cola y sus Hidrolizados

Proteicos

Además de la selección de las enzimas proteolíticas apropiadas, las condiciones fisicoquímicas del proceso, para obtener una actividad óptima de la enzima, tales como la temperatura, pH y tiempo de hidrólisis, son determinantes en la producción de hidrolizados de proteínas antioxidantes o péptidos con propiedades funcionales deseables (Samaranayaka y Li-Chan, 2011). Los péptidos antioxidantes provenientes de las proteínas de pescado se consideran moléculas seguras y saludables, de fácil absorción y bajo costo (Sarmadi e Ismail, 2010).

Uno de los factores recientemente descubiertos que hacen a los hidrolizados de proteínas de pescado un producto con propiedades antioxidantes, es el peso molecular de las fracciones peptídicas. Pesos moleculares menores a 3 kDa han sido efectivos para obtener una buena actividad celular antioxidante (Malaypally *et al.*, 2014). De igual forma el uso de enzimas específicas mejora el potencial antioxidante de los hidrolizados proteicos de pescado. El uso de Alcalasa®, por ejemplo, mejora esta propiedad al actuar como captadora de radicales libres (Intarasirisawat *et al.*, 2012), además hace que el hidrolizado obtenido presente alta solubilidad. A su vez, los resultados de muchos estudios han demostrado que la Alcalasa® ha producido hidrolizados de proteínas, con actividad antioxidante (Qian *et al.*, 2008; Sarmadi e Ismail, 2010)

Reducción del Radical DPPH

La actividad antioxidante de los HP producidos a partir de AC de sardina crinuda, determinada mediante la eliminación de radicales DPPH, mostró que los HP de AC con 20% de GH presentaron el mayor porcentaje de inhibición del radical DPPH (53.30%) a una

concentración de 50 mg/mL, y con una estimación de EC₅₀ de 43.25 mg/mL (Figura 4), los cuales son menores en comparación con los reportados para otros efluentes de la industria pesquera, tal es el caso de fracciones retenidas en filtros de 10-1 kDa (obtenidas mediante ultrafiltración) de efluentes provenientes del procesamiento de arenque en salmuera en los cuales se obtuvo 69.1% de eliminación DPPH a un concentración de 0.5 mg de proteína/mL (Taheri *et al.*, 2013), valor que en comparación con el porcentaje de eliminación DPPH determinado a 5 mg/mL (3 mg de proteína cruda por mL, aproximadamente) a los HP de agua de cola de sardina crinuda es mayor. Por su parte Hsu *et al.*, (2009) reportaron que los HP con 15 y 20%, de GH obtenidos a partir de agua de cocción de atún (*Thunnus tonggol*) exhibieron 80% y 60% de inhibición del radical DPPH respectivamente, una concentración de 5 mg/mL, valores que superan por mucho los porcentajes encontrados para los HP de 15 y 20% GH de AC de 9.1 y 9.6%, respectivamente.

De acuerdo con lo reportado por Jao y Ko (2002) quienes obtuvieron HP de agua de cocción de atún a partir de una proteasa XXIII de *Aspergillus oryzae*, la actividad inicial de inhibición del radical DPPH fue de aproximadamente 18%, esta actividad no se vio incrementada cuando se determinó al final de proceso en diferentes hidrolizados con diferentes GH. Hecho contrario a los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que el porcentaje de inhibición del radical DPPH en el caso de HP de AC de sardina, incrementó con el aumento del GH, este comportamiento se puede atribuir a la presencia de aminoácidos con capacidad antioxidante, así como a la probable disponibilidad para reaccionar con el radical en los HP con mayor GH. Con respecto a los aminoácidos que han sido reconocidos por poseer actividad antioxidante, se encontró que en los HP de 20% GH con mayor actividad antioxidante en la prueba con DPPH (TEAC 1.2 mg Trolox/ mg de HP), el contenido de Gly y Ala fue de 18.6 y 11.3% respectivamente. Otros autores han reportado que en hidrolizados proteicos, péptidos

antioxidantes con secuencias de cuatro a ocho residuos incluidos Val, Ser, Pro, His, Ala, Asp, Lys, Glu, Gly o Tyr (Jao y Ko, 2002). También en los HP de 20% se reportó una distribución de PM (% de los péptidos totales) de 62.4% en el intervalo de < 1.35 kDa, lo cual coincide con lo ya discutido en la mayor bioactividad asociada a péptidos de bajo peso molecular (cerca de 1 kDa).

Reducción del Radical ABTS

Son pocos los trabajos reportados para ABTS en efluentes pesqueros, de los cuales se puede mencionar el reporte de Pérez-Santín *et al.*, (2013), quienes reportaron un valor de actividad antioxidante medida por ABTS de 2.01, 1.91 y 3.23 mg equivalentes de vitamina C/mL en concentrados de agua de cocción de camarón (*Penaeus spp.*), la parte soluble del concentrado y la parte insoluble, respectivamente, así mismo encontraron que las fracciones ricas en péptidos de bajo peso molecular (1 kDa) y con un buen contenido de aminoácidos como Gly, tienen mayor bioactividad. Esto concuerda con el presente estudio, donde el proceso de hidrólisis enzimático efectuado sobre el AC de sardina crinuda, favoreció el incremento de la actividad antioxidante, ya que el efluente (AC) centrifugado, liofilizado y posteriormente reconstituido a una concentración de 5 mg/mL, exhibió una TEAC de 2.6 mg Trolox/mg, la cual se incrementó a 8.2, 8.9, 9.9 y 8.1 mg Trolox/mg de HP en 5, 10, 15 y 20 % de GH, respectivamente. Observándose para esta determinación que el mayor incremento en esta actividad se obtiene a un 15% GH y este disminuye cuando se sigue hidrolizando hasta el 20 % de GH.

En los HP de 15% GH, la mayor actividad en esta prueba puede ser atribuida a la presencia de aminoácidos Gly, Glu, His, los cuales se encontraron en porcentaje de 11.8, 14.1

y 11.1%, respectivamente, y han sido reconocidos como antioxidantes en péptidos de cuatro a ocho residuos de aminoácidos, además ha sido descrito que los péptidos que contienen His contribuyen con la actividad antioxidante porque donan protones del grupo imidazol de la His (Li *et al.*, 2007), mecanismo que está involucrado en la eliminación de radicales sintéticos como el ABTS.

Potencia Antioxidante Reductora Férrica (FRAP)

Los valores reportados por FRAP indican que HP de AC a diferentes GH podrían donar un electrón a los radicales libres, predominando la inhibición o estabilización de dichos radicales (Klomklao *et al.*, 2013). Por lo tanto, se espera que la hidrólisis por Alcalasa® aumente la capacidad para reducir el Fe (III) a Fe (II) en el complejo TPTZ utilizado en la técnica, por la disponibilidad de grupos de aminoácidos capaces de interactuar con el complejo. Esta capacidad ha sido encontrada en HP de subproductos sólidos como los elaborados por hidrólisis con distintas enzimas (Flavourzyme, Alcalasa, protamex y neutrasa) del hígado de atún (*Katsuwonus pelamis*) (Je *et al.*, 2009), HP de cabeza y vísceras de *Sardinella aurita* hidrolizada con Alcalasa® (Barkia *et al.*, 2010), HP a partir de la hidrólisis con Alcalasa® de gelatina de la piel de *Priacanthus macracanthus* (Phanturat *et al.*, 2010). Sin embargo, es poca la bibliografía para efluentes pesqueros, entre ellos se reportan los trabajos de Pérez-Santín *et al.*, (2013), quienes reportaron valores de 6.64 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ eq/mL en concentrados de proteína en agua de cocción de camarón (*Penaeus spp*). En el AC de sardina que se estudió en este trabajo se observó que existe un incremento de la actividad antioxidante reductora férrica con la hidrólisis de las proteínas contenidas en esta, obteniendo el incrementos en el potencial con el incremento de la concentración y el incremento en el GH,

pero destacando el mayor potencial en el HP al 15 % GH, lo que puede estar relacionado de nuevo con la composición, ya que la presencia de aminoácidos como la His (11.1%) en este HP le permite exhibir mejor (en comparación de los otros GH estudiados) la propiedad de quelar metales a través de su grupo imidazol mediante la donación de protones (Li *et al.*, 2007).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

A partir del agua de cola de sardina crinuda (*Opisthonema libertate*), se lograron obtener hidrolizados de proteína utilizando la enzima comercial Alcalasa®. Las condiciones que se establecieron para el proceso de hidrólisis fueron: pH 9, temperatura 55°C, y 3% de enzima en relación al contenido proteico en la mezcla de reacción. Usando estas condiciones se obtuvieron hidrolizados proteicos con grados de hidrólisis de 5, 10, 15 y 20% a los 0.45, 2.6, 35.7 y 223 minutos de reacción, respectivamente.

Con respecto a la caracterización bioquímica del agua de cola de sardina crinuda (*Opisthonema libertate*) e hidrolizados proteicos obtenidos a partir de ella, el contenido de proteína cruda se mantuvo similar, no así la cantidad de cenizas y lípidos, ya que se observó un incremento de cenizas y una disminución de lípidos en los HP. El contenido de proteína de los hidrolizados de agua de cola de sardina, se ubicó en el rango de 56 al 66 %, lo que potencializa su uso en la alimentación animal y humana.

Mediante el análisis de la distribución de pesos moleculares de los péptidos presentes en los HP, se encontró una relación directa del grado de hidrólisis con una mayor cantidad de péptidos con bajos pesos moleculares, predominando péptidos en los rangos de 17 - 1.35 y menores a 1.35.

En lo relacionado a la composición de aminoácidos, el agua de cola de sardina crinuda analizada en este estudio, un 51.5% de los aminoácidos totales son esenciales, indicando así que este efluente es una fuente adecuada de este tipo de compuestos de importancia nutricional. Asimismo, el HP con 15 % de GH, presentó el contenido más elevado de aminoácidos azufrados (Met y Tau) y aromáticos (Phe y Tyr), lo cual puede estar relacionado con su elevada actividad antioxidante *in vitro*.

Tanto el AC como los HP producidos a partir de ella, exhibieron actividad antioxidante *in vitro*, siendo los HP con 15% GH los que exhibieron la capacidad antioxidante más elevada mediante la técnica de reducción del radical ABTS y potencia reductora férrica (FRAP) con valores de TEAC a una concentración de 5 mg/mL medidos por las técnicas de DPPH, ABTS y FRAP de 0.6, 9.9 y 340.2 mg de Trolox/mg de muestra, respectivamente, así como valores de EC₅₀ estimadas por las técnicas de DPPH y ABTS de 46.53 y 2.8 mg/ mL, respectivamente.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, sugieren que los hidrolizados proteicos de agua de cola con diferentes grados de hidrólisis (5, 10, 15 y 20 % GH) poseen capacidad para reducir radicales libres o especies reactivas de oxígeno, siendo los HP con 15% de GH, los que exhibieron el mayor potencial antioxidante *in vitro*.

CAPÍTULO VI

PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

- Enriquecer el estudio de las propiedades bioactivas de los hidrolizados proteicos obtenidos a partir de AC, en los cuales se evalúen otras bioactividades, tales como antihipertensiva, antimutagénica, antihipoglucemiante, y antiproliferativa, con el objetivo de potencializar su aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica.
- Utilizar como ingredientes funcionales a los HP de agua de cola de sardina en alimentos formulados acuícolas, para así observar su posible efecto sobre parámetros productivos, fisiológicos y metabólicos de organismos acuáticos de interés comercial.
- Realizar estudios de purificación de los péptidos bioactivos responsables de la actividad biológica de los HP obtenidos a partir de agua de cola de sardina.
- Desarrollar procesos más económicos, sencillos y viables y con tecnología de bajo coste que pueden ser aplicados al aprovechamiento de los subproductos generados en la elaboración de la harina de pescado.

REFERENCIAS

- Adler-Nissen, J. (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier applied science publishers.
- Ahumada, R., Rudolph, A., Contreras, S. (2004). Evaluation of coastal waters receiving fish processing waste: Lota Bay as a case study. *Environmental Monitoring and Assessment*. 90(1-3):89-99.
- Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillen, M., Montero, P. (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*. 44(4):1044-1051.
- AOAC. 2010 Official Methods of Analysis. 24th. ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Archer, M. (2001). Fish waste production in the United Kingdom. *The Sea Fish Industry Authority, Seafood Reports*. Seafish Report Number SR537.
- Arvanitoyannis, I.S., Kassaveti, A. (2008). Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science and Technology*. 43 (4):726-745.
- Asbjorn, G. (2004). Enzymes and bioactive peptides from fish waste relate to fish silage, fish feed and fish sauce production. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 13(2):3–11.
- Atkinson, A. B., Robertson, J. I. S. (1979). Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac failure. *The Lancet*. 314(8147):836-839.

- Balaswamy, K., Prabhakara Rao, P. G., Narsing Rao, G., Jyothirmayi, T. (2011). Functional properties of roe protein hydrolysates from Catla. *Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry*. 10(4):2139-2147.
- Barkia, A., Bougatef, A. L. I., Khaled, H. B., Nasri, M. (2010). Antioxidant activities of sardinelle heads and/or viscera protein hydrolysates prepared by enzymatic treatment. *Journal of Food Biochemistry*. 34:303-320.
- Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N. M., Nunes, M. L. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbard fish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*. 45(1):18-24.
- Bechtel, P. J. (2005). Properties of stick water from fish processing by products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 14:25–38.
- Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239(1):70-76.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Maní, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., Nasri M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*. 118(3):559-565.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Ravallec-Plé, R., Leroy, Y., Guillochon, D., Barkia, A., Nasri, M. (2008). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. *Food Chemistry*. 111(2):350-356.
- Bucci, L., Unlu, L. (2000). Proteins and amino acid supplements in exercise and sport. *Energy-Yielding Macronutrients and Energy Metabolism in Sports Nutrition*. 191-212.

- Bueno-Solano., López-Cervantes, J., Campas-Baypoli, O.N., Lauterio-Garcia, R., Adan-Bante, N.P., Sánchez-Machado, D.I. (2009). Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chemistry*. 112(3):671-675, 0308-8146.
- Cabrera, C.C. (1999). Compatibilidad ambiental de la industria de la harina de pescado en Paracas-Pisco. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*. 2:119–134.
- Castillo, P., Rao, R., Liuzzo, J. (1987). Potential of acid activated clay in the clarification of menhaden stick water. *Journal of Environmental Science and Health*. 4:471–489.
- Castro-Ceseña, A. B., del Pilar Sánchez-Saavedra, M., Márquez-Rocha, F. J. (2012). Characterization and partial purification of proteolytic enzymes from sardine by-products to obtain concentrated hydrolysates. *Food Chemistry*. 135(2):583-589.
- Chalamaiah, M., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chemistry*. 135(4):3020-3038.
- Cushman, D. W., Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*. 20(7):1637-1648.
- Del Valle, J., Aguilera, J. (1991). Physicochemical characterization of raw fish and stick water from fish mal production. *Journal of Science Food and Agriculture*. 54:429–441.
- Deng, S.G., Huo, J.C. Xie, C. (2008). Preparation by enzymolysis and bioactivity of iron complex of fish protein hydrolysate (Fe-FPH) from low value fish. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 26(3):300-306.

- Dey, S., Dora, K. (2011). Antioxidative activity of protein hydrolysate produced by alcalase hydrolysis from shrimp waste (*Penaeus monodom* and *Penaeus indicus*). *Journal of Food Science and Technology*. 51(3):449-457.
- Elias, R.J., Kellerby, S.S., Decker, E.A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48(5).430-441.
- Erdmann, K., Cheung, B. W., Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 19(10):643-654.
- Ezquerro J. M. (2014). Química, Bioquímica y estructura de los subproductos de la pesca Universidad de Sonora. ISBN 978-607-518-093-9.
- Fahmi, H. (2004). mPGES-1 as a novel target for arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*. 16(5):623-627.
- FAO (2016). El estado mundo al de la pesca y la acuicultura. Roma: Departamento de Pesca y Agricultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Ferraro, V., Carvalho, A.P., Piccirillo, C., Santos, M.M., Castro, P.M., Pintado, M.E. (2013). Extraction of high added value biological compounds from sardine, sardine-type fish and mackerel canning residues - A review. *Materials Science And Engineering*. 33C(6):3111-3120.
- Fuller, H.L., Carrick, C.W., Hauge, S.M. (1952). A comparison of B12, fish solubles and whey in the growth of chicks. *Poultry Science*. 31(3):473-478.
- García, S.C.O. (2007). Generación de efluentes con baja carga contaminante y caracterización de solidos derivados del agua de cola tratada por centrifugación y ajuste de pH. Tesis

- doctoral, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora, México.
- García-Sifuentes, C.O., Pacheco-Aguilar, R., Valdez-Hurtado, S., Márquez-Rios, E., Lugo-Sánchez, M.E., Ezquerro-Brauer, J.M. (2009). Impact of stickwater produced by the fishery industry: treatment and uses. *CyTA—Journal of Food*. 7(1):67-77.
- Gonzalez, J.F. (1996). Waste water treatment in the fishery industry. FAO Fisheries Technical Paper. 355 p. Roma: FAO.
- Goycoolea, F., Nieblas, J., Noriega, L., Higuera-Ciapara, I. (1997). Temperature and concentration effects on the flow behavior of stick water. *Bioresource Technology*. 59:217–225.
- Guerrero, L., Omil, F., Méndez, R., Lema, J. (1998). Protein recovery during the overall treatment of waste waters from fish-meal factories. *Bioresource Technology*. 63:221–229.
- Hathwar, S.C., Bijinu, B., Rai, A.K., Narayan, B. (2011). Simultaneous recovery of lipids and proteins by enzymatic hydrolysis of fish industry waste using different commercial proteases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 164(1):115-124.
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(3):588-593.
- Hsu, K. (2010). Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry*, 122(1):42-48, 0308-8146.

- Hsu, K.-C., G.-H. Lu and C.-L. Jao, Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with orientase (*Bacillus subtilis*). *Food Research International*, 2009. 42(5): p. 647-652.
- Huang, G.R., Zhao, J. y Jiang, J.X. (2011). Effect of defatting and enzyme type on antioxidative activity of shrimp processing byproducts hydrolysate. *Food Science and Biotechnology*, 20(3): 651-657, 1226-7708.
- Hung, C. C., Yang, Y. H., Kuo, P. F., & Hsu, K. C. (2014). Protein hydrolysates from tuna cooking juice inhibit cell growth and induce apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7. *Journal of Functional Foods*, 11, 563-570.
- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Wu, J. (2012). Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. *Food chemistry*, 135(4), 3039-3048.
- Jao, C. L., & Ko, W. C. (2002). 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice. *Fisheries Science*, 68(2), 430-435.
- Je, J.Y., Lee, K.H., Lee, M.H., Ahn, C.B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*. 42(9): 1266-1272.
- Jones, D.P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxidants and Redox Signaling*. 8(9-10):1865-1879.
- Kawasaki, T., Jun, C.J., Fukushima, Y., Kegai, K., Seki, E., Osajima, K., Matsumoto, K. (2002). Antihypertensive effect and safety evaluation of vegetable drink with peptides derived from sardine protein hydrolysates on mild hypertensive, high-normal and normal blood pressure subjects. *Fukuoka Igaku Zasshi = Hukuoka Acta Medica*. 93(10):208-218.

- Khantaphant, S., Benjakul, S., Kishimura, H. (2011). Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial proteases. *Process Biochemistry*. 46(1):318-327.
- Kim, S.-K., Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. *Journal of Functional Foods*. 2(1):1–9.
- Kitts, D.D., Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*. 9(16):1309-1323.
- Klomklao, S., Benjakul, S. (2018). Protein Hydrolysates Prepared from the Viscera of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelmamis*): Antioxidative Activity and Functional Properties. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 18(1):69-79.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*. 102(4):1317-1327.
- Kumar, U.U., Rajanna, K.C., Saiprakash, P.K. (2011). A kinetic and mechanistic study of hydrolysis of thiamine pyrophosphate (Cocarboxylase) in aqueous buffer and micellar media. *International Journal of ChemTech Research*. 3(3):1088-1095.
- Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B., Wu, Y. (2007). Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. *Food Chemistry*. 102(4):1135-1143.
- Majluf, P., Barandiaran, A., Sueiro, J.C. (2007). Evaluación del sector pesquero en Perú. Lima, Perú: CONAM.

- Malaypally, S.P., Liceaga, A.M., Kim, K.H., Ferruzzi, M., San Martin, F., Goforth, R.R. (2015). Influence of molecular weight on intracellular antioxidant activity of invasive silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 18:1158-1166.
- Mamelona, J., Saint-Louis, R., Pelletier, E. (2010). Nutritional composition and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from echinoderm byproducts. *International Journal of Food Science and Technology*. 45(1):147-154.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H.G., Kim, S.K. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their *in vitro* antioxidant effects. *Life Sciences*. 77(17):2166-2178.
- Murray, B. A., FitzGerald, R.J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*. 13(8):773-791.
- Najafian, L., Babji, A.S. (2012). A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. *Peptides*. 33(1):178-185.
- Ngo, D.H., Qian, Z.J., Ruy B., Park J.W., Kim, S.K. (2010). *In vitro* antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical mediated oxidative systems. *Journal of Functional Foods*. 2(2):107-117.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Supphantharika, M., Assavanig, A. (2005). Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering*. 70(4):571-578.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales.

- Ockerman, H.W., Hansen, C.L. (1999). *Animal by-product processing & utilization*. CRC Press.
- Pacheco-Aguilar, R., Leyva-Soto, P., Carvallo-Ruiz, G., García-Carreño, L.F., Márquez-Ríos, E. (2009). Efecto de la concentración de quitosano y pH sobre la remoción de sólidos en agua de cola de la industria sardinera. *Interciencia*. 34(4):274-279.
- Pérez-Santín, E., Calvo, M.M., López-Caballero, M.E., Montero, P., Gómez-Guillén, M.C. (2013). Compositional properties and bioactive potential of waste material from shrimp cooking juice. *LWT-Food Science and Technology*. 54(1):87-94.
- Qian, Z.J., Jung, W. K., Kim, S.K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource Technology*. 99(6):1690-1698.
- Ramírez-Suarez, J.C., Pacheco-Aguilar, R., Ponce-Alquicira, E., Lugo-Sánchez, M.E., Villalobos-Rodríguez, A., Ortiz-Delgado, I G. (2010). Bioactivities found in Sardine (*Sardinops sagax caerulea*) byproduct hydrolysates. *A Sustainable Future: Fish Processing Byproducts*. 295-309.
- Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., Xue, S.J. (2008). Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*. 108(2):727-736.
- Roslan, J., Yunos, K.F.M., Abdullah, N., Kamal, S.M.M. (2014). Characterization of fish protein hydrolysate from tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 2:312-319.
- Rustad, T. (2003). Utilization of marine by-products. *Electronic Journal of Environmental Agriculture and Food Chemistry*. 2(4):458-463.

- Rustad, T., Hayes, M. (2012). Marine bioactive peptides and protein hydrolysates: Generation, isolation procedures, and biological and chemical characterizations. En: *Marine Bioactive Compounds* (pp. 99-113). Springer, Boston, MA.
- Samaranayaka, A. G., Li-Chan, E. C. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*. 3(4):229-254.
- Samaranayaka, A.G., Li-Chan, E.C. (2008). Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*). *Food Chemistry*. 107(2):768-776.
- Samaranayaka, A.G.P., Li-Chan, E.C.Y. (2011). Food-derived peptide antioxidants: a review of their production, assessment and potential applications. *Journal of Functional Foods*. 3(4):229-254, 1756
- Sarmadi, B. H., Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*. 31(10):1949-1956.
- Sathivel, S., Bechtel, P.J. (2006). Properties of soluble protein powders from Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*). *International Journal of Food Science and Technology*. 41(5):520–52
- Sathivel, S., Bechtel, P.J., Babbitt, J., Prinyawiwatkul, W., Negulescu, I.I., Reppond, K.D. (2004). Properties of protein powders from arrow tooth flounder (*Atheresthes stomias*) and herring (*Clupea harengus*) byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(16):5040-5046.
- Sathivel, S., Bechtel, P.J., Babbitt, J.K., Prinyawiwatkul, W., Patterson, M. (2005). Functional, nutritional, and rheological properties of protein powders from arrow tooth flounder and their application in mayonnaise. *Journal of Food Science*. 70(2):57–63.

- SEMARNAT. (2012). Compendio de estadías ambientales 2012. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
- Shahidi, F. (2006). Maximizing the value of marine by-products: an overview. En: Shahidi, F. (Ed.). *Maximizing the value of Marine by products*. St. Johns, NL, Canada: CRC Pres. (532 pp.).
- Son, B.W., Kim, J.C., Choi, H.D., Kang, J.S. (2002). A radical scavenging farnesyl hydroquinone from a marine-derived fungus *Penicillium sp.* *Archives of Pharmacal Research*. 25(1):77-79.
- Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M. (2007). Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food technology and biotechnology*. 45(2):187.
- Toopcham, T., Mes, J.J., Wichers, H.J., Roytrakul, S., Yongsawatdigul, J. (2017). Bioavailability of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 proteinases hydrolyzed tilapia muscle proteins. *Food Chemistry*. 220:190-197.
- Udenigwe, C. C., Aluko, R. E. (2011). Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(5):3148-3161.
- Valdez, H. S. (2006). Caracterización proximal y tratamiento enzimático del agua de cola generada por una industria productora de harina de pescado en Sonora. Tesis doctoral. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Hermosillo, Sonora, México.

- Wang, Y.K., He, H.L., Wang, G.F., Wu, H., Zhou, B.C., Chen, X.L., Zhang, Y.Z. (2010). Oyster (*Crassostrea gigas*) hydrolysates produced on a plant scale have antitumor activity and immunostimulating effects in BALB/c mice. *Marine Drugs*. 8(2):255-268.
- Wu, D., Zhou, L., Gao, M., Wang, M., Wang, B., He, J., Zhang, Y. (2018). Effects of stickwater hydrolysates on growth performance for yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture*. 488:161-173.
- Wu, S., Yue, Y., Tian, H., Li, Z., Li, X., He, W., Ding, H. (2003). Carthamus red from *Carthamus tinctorius* L. exerts antioxidant and hepatoprotective effect against CCl₄-induced liver damage in rats via the Nrf2 pathway. *Journal of Ethnopharmacology*. 148(2):570-578.
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M., & Ren, J. (2011). *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* anti-fatigue effect of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion. *Food Chemistry*. 124(1):188-194.
- Zhou, D.Y., Tang, Y., Zhu, B.W., Qin, L., Li, D.M., Yang, J.F., Murata, Y. (2012). Antioxidant activity of hydrolysates obtained from scallop (*Patinopecten yessoensis*) and abalone (*Haliotis discushannai* Ino) muscle. *Food Chemistry*. 132(2),815-822.