



# UNIVERSIDAD DE BURGOS

FACULTAD DE CIENCIAS

Trabajo Fin de Grado en Química

*Curso 2021/2022*

---

## **ESTUDIO SOBRE HIDRÓLISIS PROTEICA CON AGUA SUBCRÍTICA PARA LA VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS MARINOS**

Belén Álvarez Soto

Tutores: María Teresa Sanz Díez y Rodrigo Melgosa Gómez

Área de Ingeniería Química

Marzo de 2022





UNIVERSIDAD  
DE BURGOS

Facultad de Ciencias

**VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL  
TRABAJO FIN DE GRADO** <sup>(1)</sup>

**GRADO EN: Química**

**CURSO: 2021-2022**

Dña. María Teresa Sanz Diez y Don Rodrigo Melgosa Gómez, Tutores Académicos, informan de que el alumna Dña. Belén Álvarez Soto., ha realizado el Trabajo Fin de Grado que lleva por título “ESTUDIO SOBRE HIDRÓLISIS PROTEICA CON AGUA SUBCRÍTICA PARA LA VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS MARINOS” bajo su tutela y considera que la memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO \*

(\*) En caso negativo, indíquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 4 de marzo de 2022

Fdo.: María Teresa Sanz Diez

Fdo.: Rodrigo Melgosa Gómez

**(1)** Las memorias presentadas deberán contar con el visto bueno de los tutores. A tal efecto, **se incluirá en la contraportada este documento con la firma de los mismos.** (Regulación del reglamento interno de la facultad de ciencias para la gestión de la asignatura “Trabajo Fin de Grado” de la Facultad de Ciencias, aprobada en Junta de Facultad de 11 de febrero de 2022)



## AGRADECIMIENTOS:

El trabajo presentado ha sido desarrollado en el seno del Grupo de Investigación Biotecnología Industrial y Medioambiental, reconocido por la UBU (GIR-UBU BIOIND) y por la Junta de Castilla y León como Unidad de Investigación Consolidada UIC-128, en el marco de los siguientes proyectos de investigación:

- VALORIZACIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA DE CASTILLA Y LEÓN MEDIANTE TECNOLOGÍAS DE FLUIDOS PRESURIZADOS (PROVALOR), financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (BU050P20).
- VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS MARINOS MEDIANTE TECNOLOGÍAS DE FLUIDOS SUB- Y SUPERCRÍTICOS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOCMPUESTOS VALIOSOS, financiado por la Agencia Estatal de Investigación (10.13039/501100011033).



## ÍNDICE

<b>Resumen/ Abstract</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos / Objectives</b>	<b>3</b>
<b>3. Materiales y métodos</b>	<b>3</b>
3.1 Materia prima	3
3.2 Extracción de proteína soluble	4
3.3 Hidrólisis de proteína soluble	5
3.4 Determinación de proteínas en disolución. Métodos analíticos	6
3.5 Análisis de aminoácidos libres	7
3.6 Distribución de pesos moleculares en los hidrolizados proteicos	8
3.7 Actividad antioxidante	8
<b>4. Resultados y discusión</b>	<b>9</b>
4.1 Extracción de proteína soluble	9
4.2 Métodos analíticos, grado de hidrólisis de la proteína soluble y contenido en aminoácidos libres.	12
4.3 Distribución de pesos moleculares en los hidrolizados proteicos	16
4.4 Actividad antioxidante	17
<b>5. Conclusiones</b>	<b>20</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>20</b>



## Resumen/ Abstract

---

La conversión de los subproductos de la industria pesquera en nuevas aplicaciones sienta las bases hacia un futuro más sostenible. Las proteínas de pescado presentan una composición rica en aminoácidos esenciales, de ahí que sea necesario su aprovechamiento. Este trabajo se basa en la optimización de la extracción de proteína soluble de harina de pescado a diferentes temperaturas (20, 50 y 80 °C) y a diferentes concentraciones (4, 8, 16, 24, 50 g/100mL) para su valoración, empleando tecnologías verdes. Con el objetivo de obtener la fracción proteica hidrolizada del extracto de proteína mediante dos técnicas y así poder evaluar el perfil de aminoácidos libres y el rendimiento de las mismas mediante el grado de hidrólisis. Se lleva a cabo la hidrólisis mediante agua subcrítica (sCW) a diferentes temperaturas (140, 160 y 180 °C), presurizando con dos gases (N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>) y la hidrólisis enzimática bajo la acción de dos enzimas comerciales: Alcalasa y Novozym. Una vez optimizadas las condiciones de la extracción de proteína soluble y las hidrólisis se realiza una experiencia con harina de pescado desengrasada para comprobar si existen diferencias debido a la presencia o ausencia de grasa. También se comprueban la distribución de pesos moleculares de los hidrolizados y su capacidad antioxidante.

The transformation of by-products from the fishing industry into products for new applications lays the foundation for a more sustainable future. Fish proteins have a high content of essential amino acids, hence the need to exploit them. This work is based on the optimization of the extraction of soluble protein from fish flour at different temperatures (20, 50 and 80°C) and at different concentrations (4, 8, 16, 24 and 50g/100mL) for its evaluation using green technologies. With the objective of obtaining the hydrolyzed proteic fraction of the protein extract through two different techniques and thus being able to evaluate their yield by comparing the degree of hydrolysis and the profile of free amino acids obtained. Hydrolysis is carried out using subcritical water (sCW) at different temperatures (140, 160 and 180°C), pressurizing with two gases (N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>). Enzymatic hydrolysis is implemented under the action of two commercial enzymes: Alcalase and Novozym. Once the conditions for the extraction of soluble protein and the hydrolysis have been optimized, an experiment is carried out with defatted fish flour to check if there are differences due to the presence or absence of fat. The molecular weight distribution of the hydrolysates and their antioxidant capacity are also checked.

## 1. Introducción

---

La producción pesquera a nivel mundial aumenta de forma constante. Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (UN-FAO), el consumo de pescado alcanzó en 2018 los 179 Mt. Asimismo, los subproductos derivados de la pesca siguen la misma tendencia, con una producción en 2018 de 22 Mt a nivel mundial (FAO, 2020).

Estos subproductos pesqueros, que antiguamente eran desechados generando un gran cúmulo de residuos, han cobrado una gran importancia debido a la necesidad de usar recursos naturales extraídos del mar de una forma más eficiente y sostenible (Blanco et al., 2007).

Actualmente, los subproductos de pescado presentan diferentes usos, reutilizándolos para aportarles una nueva vida útil en base a la economía circular (Lieder & Rashid, 2016). Son empleados en la fabricación de piensos, harina de pescado, generación de biocombustibles, etc. También son objeto de prometedores proyectos para su aplicación en tratamientos médicos, cosméticos, industria alimentaria o tratamiento de aguas (Khawli et al., 2019). Recientemente, se está dando una importante tendencia en la industria de bioprocesos marinos por convertir y utilizar la mayoría de los subproductos alimentarios marinos como valiosos ingredientes funcionales (Kim & Mendis, 2006).

Las proteínas de pescado presentan un alto valor biológico, por lo que nutricionalmente son muy atractivas para su reutilización en la industria alimentaria. No obstante, el interés en las proteínas marinas no solo está correlacionado con la proteína en sí, sino también con la posibilidad de generar péptidos bioactivos. Estos compuestos comprenden cadenas cortas de aminoácidos, que no presentan ninguna bioactividad antes de liberarse de la proteína madre. Sin embargo, tras el procesamiento a alta presión o mediante la digestión enzimática, estos péptidos se liberan y son capaces de ejercer efectos beneficiosos para la salud (Ngo et al., 2011), presentando un gran potencial nutracéutico, farmacéutico y cosmeceútico. Algunos péptidos bioactivos presentan una gran capacidad antioxidante que se ha relacionado con la prevención de varias enfermedades, incluyendo cáncer, enfermedades coronarias, trastornos inflamatorios, degeneración neurológica y envejecimiento (Shahidi & Zhong, 2017). Las especies reactivas de oxígeno y los radicales libres contienen electrones desemparejados en su capa de valencia y atraen a electrones de otras sustancias, generando daño en células o tejidos mediante oxidación. Los antioxidantes tienen gran importancia, ya que son sustancias que retrasan o inhiben dicha oxidación (Chalamaiah et al., 2012).

Existen diversos métodos para obtener proteínas de pescado e hidrolizarlas para obtener péptidos bioactivos. La hidrólisis química es el método de hidrólisis proteica convencional, el cual presenta gran efectividad de debido a las altas concentraciones de ácidos o bases empleados para hidrolizar proteínas. Pero, conlleva a la destrucción de ciertos aminoácidos, presenta problemas de peligrosidad y toxicidad en el tratamiento. Además, de problemas ambientales en la gestión de los residuos.

Recientemente, se desarrollan métodos alternativos a los convencionales, basados en los principios de la química verde. Se define como química verde al *modus operandi* de invención, diseño y aplicación de productos químicos para reducir al mínimo o eliminar el uso y la generación de sustancias peligrosas para el medio ambiente (Gupta et al., 2010). En este trabajo se aplican diferentes técnicas verdes de hidrólisis de proteína de pescado, hidrólisis proteica enzimática e hidrólisis mediante agua subcrítica (sCW).

La hidrólisis con sCW se basa en las propiedades subcríticas del agua. Partiendo de la base de que el agua es el disolvente universal en condiciones normales, en condiciones subcríticas el agua presenta estado líquido bajo condiciones presurizadas entre la temperatura de ebullición habitual, 100 °C y la temperatura crítica del agua, 374 °C. Por lo que, sCW hidroliza la proteína a péptidos y aminoácidos debido a que en condiciones subcríticas actúa como catalizador ácido o básico por su gran concentración de iones hidronio,  $H_3O^+$  e hidróxido,  $OH^-$  sin necesidad de catalizadores adicionales como ácidos o enzimas (Akiya & Savage, 2002).

También, ha cobrado importancia la hidrólisis enzimática debido a las condiciones suaves de trabajo y a la especificidad de las mismas. La principal ventaja de la hidrólisis enzimática de proteínas es que permite la cuantificación de aminoácidos sensibles, que normalmente son destruidos por hidrólisis ácida y básica (Ghaly, 2013).

## 2. Objetivos / Objectives

---

Este trabajo se engloba dentro de un Proyecto más extenso llevado a cabo por el grupo de investigación Biotecnología Industrial y Medioambiental (BIOIND) dentro del área de Ingeniería Química de la Universidad de Burgos, denominado: *Valorización de subproductos marinos mediante tecnologías de fluidos sub- y supercríticos para la obtención de biocompuestos valiosos.*

Los objetivos específicos de este Trabajo Fin de Grado son:

- Optimizar el proceso de extracción de proteína soluble de harina de pescado en distintas condiciones.
- Optimizar la hidrólisis de proteína soluble empleando tecnologías verdes. Aplicando agua subcrítica y catálisis enzimática.
- Caracterizar los extractos hidrolizados en términos de proteína total, grado de hidrólisis, perfil de aminoácidos, tamaño proteico y capacidad antioxidante.
- Determinar si existe mayor rendimiento empleando proteína con grasa o proteína desgrasada.

This work is included within a more extensive project carried out by the Industrial and Environmental Biotechnology research group (BIOIND) within the Chemical Engineering area of the University of Burgos, called: *Valorization of marine by-products through sub- and sub-fluid technologies supercritical to obtain valuable biocomposites.*

The specific objectives of this Final Degree Project are:

- Optimize the process of extracting soluble protein from fish flour under different conditions.
- Optimize the hydrolysis of soluble protein using green technologies. Applying subcritical water and enzymatic catalysis.
- Characterize the hydrolyzed extracts in terms of total protein, degree of hydrolysis, amino acid profile, protein size and antioxidant capacity.
- Determine if there is greater yield using protein with fat or defatted protein.

## 3. Materiales y métodos

---

### 3.1 Materia prima

Como materia prima para la obtención de proteína soluble de pescado, se ha empleado harina de pescado con grasa procedente de Sarval Bio-industries Noroeste, S.A.U. debido a su alta concentración en proteínas.

#### 3.1.1 Caracterización

La harina de pescado ha sido caracterizada *previamente en el área de Ingeniería Química*, mostrando los resultados recogidos en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composición de la harina de pescado empleada en este trabajo.

<b>Compuesto</b>	<b>%, en base seca</b>
Proteínas*	51 ± 4
Lípidos	9.2 ± 0.6
Cenizas	21.7 ± 0.2

(\*) Obtenido a partir de nitrógeno elemental, empleando el factor-N de 4.8 obtenido mediante el perfil de aminoácidos de la fracción proteica de la harina.

En la *Tabla 1* se observa una importante fracción proteica, cuya valorización es el objetivo de este TFG. El perfil de aminoácidos de la harina de pescado se muestra en la *Tabla 2*, donde se puede observar que posee una importante cantidad de aminoácidos esenciales, suponiendo un 42 % del total de aminoácidos. También, destaca un elevado porcentaje de grasa, que puede causar problemas de rancidez en los hidrolizados proteicos obtenidos. Por ello, como pretratamiento de la materia prima se propone su desengrasado. El desengrasado de la harina de pescado, se realizó empelando CO<sub>2</sub> supercrítico (CO<sub>2</sub>-SC).

La utilización de CO<sub>2</sub>-SC como disolvente está cada vez más extendido debido a sus características intermedias entre líquido y vapor. Actúa como líquido para disolver sustancias apolares como la grasa presente en la harina de pescado, pero también se comporta como un gas con baja tensión superficial, baja viscosidad y elevada difusividad, propiedades que facilitan su impulsión y mejoran la transferencia de masa. El CO<sub>2</sub>-SC es inocuo y no inflamable. Además es un gas en condiciones atmosféricas, por lo que al finalizar el proceso, el disolvente se evapora completamente y extracto y refinado quedan puros (Rubio-Rodríguez et al., 2008).

En cambio, en métodos tradicionales como la extracción Soxhlet (SE), se emplean disolventes orgánicos, inflamables y tóxicos, que necesitan de procedimientos adicionales para su eliminación y pueden quedar presentes en el extracto a nivel de traza. (Ferreira et al., 2022)

La extracción de grasa con CO<sub>2</sub> supercrítico a alta presión la realizó el *departamento de Ingeniería Química* basado en el artículo previo (Bucio et al., 2016), bajo las condiciones óptimas de 400 bar de presión, 60 °C de temperatura, durante 4h.

### 3.2 Extracción de proteína soluble

Con el objetivo de optimizar la extracción de proteína soluble se varió la proporción de harina de pescado, fish flour (FF)/disolvente desde los 4 g hasta los 50 g por cada 100 mL de agua destilada. Las cinéticas se llevaron a cabo en un reactor de vidrio encamisado a reflujo a 80°C durante 30 minutos a diferentes concentraciones de FF: 4g/100mL, 8g/100mL, 16g/100mL, 24g/100mL y 50g/100mL. Para la relación 16g/100 mL, se llevó la extracción a tres temperaturas diferentes, 20, 50 y 80°C.

Procedimiento: 100 mL de agua se introducen en un Erlenmeyer y se llevan a la temperatura de trabajo en un baño termostatzado. A continuación, se añade la cantidad de FF necesaria, según la concentración deseada. Seguidamente, se enciende la agitación magnética y se da por comenzada la cinética. El seguimiento de la extracción de proteína soluble se realizó mediante la toma de muestras a diferentes tiempos. Las muestras se enfrían en baño de hielo,

se centrifugan a 5000 rpm durante 30 minutos a 4°C, se filtran y se almacenan en congelador a -21°C para su posterior análisis.

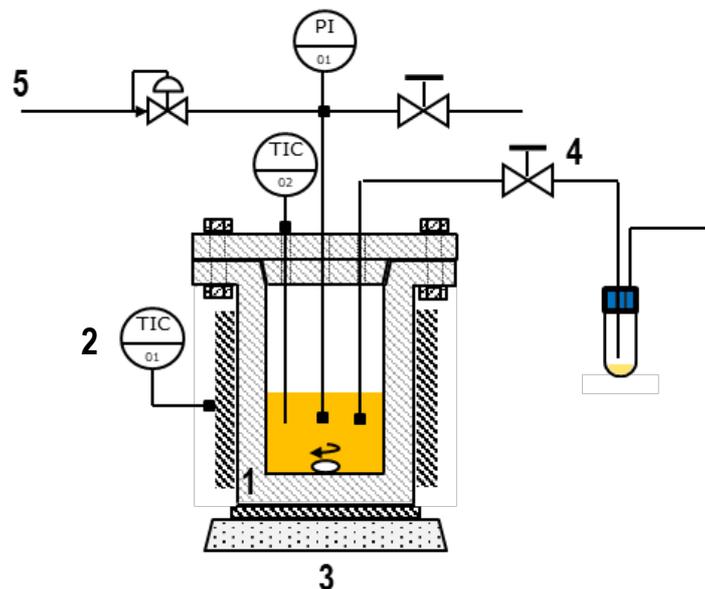
En las mejores condiciones de extracción determinadas se realiza una extracción de proteína soluble de harina de pescado desgrasada, defatted fish flour (DFF), para poder comparar ambas.

### 3.3 Hidrólisis de proteína soluble

#### 3.3.1 Hidrólisis con agua subcrítica (sCW)

Se utilizó un reactor discontinuo diseñado y montado por el Área de Ingeniería Química de la Universidad de Burgos. La representación esquemática se recoge en la *Figura 1*.

El equipo consiste en un recipiente de acero inoxidable capaz de resistir altas temperaturas y presiones (1). Se encuentra recubierto por una camisa calefactora con una resistencia cerámica de 2000 W, controlada mediante un potenciómetro (2), y colocado sobre una placa de agitación magnética (3). El equipo está dotado de una conducción sifonada conectada al circuito de muestreo (4), que permite extraer muestras a distintos tiempos y seguir las cinéticas de hidrólisis. Para mantener una presión estable durante el experimento, se introduce un gas presurizado (N<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub>) a través de una conducción de alta presión (5). Además, presenta todos los elementos necesarios para el seguimiento y control de temperatura y presión.



*Figura 1. Equipo experimental de Extracción de Líquidos a Presión (PLE) en configuración discontinua. Indicadores (I) y Controladores (C) de Temperatura (T) y Presión (P).*

Antes de comenzar con las cinéticas de hidrólisis, se obtuvieron rampas de temperatura frente al tiempo. Con agua destilada dentro del reactor, para obtener los perfiles de calentamiento del equipo. Se observó una velocidad de calentamiento de aproximadamente 3.5 °C/min.

La hidrólisis en agua subcrítica del extracto de proteína soluble se realizó con distintos gases: N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Todos los experimentos se realizan bajo una presión de 40 bar y una potencia de calentamiento del 50%. Se realiza a diferentes temperaturas: 140 °C, 160 °C y 180 °C.

En las cinéticas de hidrólisis con agua subcrítica se toman muestras a diferentes tiempos, enfriándolas en un baño de hielo. Seguidamente, se centrifugan, y se filtran para caracterizarlas mediante las técnicas analíticas que se describen posteriormente. Las muestras hidrolizadas se almacenan en congelador a  $-21^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

### 3.3.2 Hidrólisis enzimática

Se realizan cinéticas con el extracto de proteína soluble de FF y DFF en proporción 16g/100mL con dos enzimas comerciales de Novozymes a 225 u: 2.72 % Alcalasa y 3.74 % Novozym  $\frac{\text{g}_{\text{enzima}}}{100 \text{ g}_{\text{proteína soluble}}}$ . Bajo las condiciones óptimas de:  $60^{\circ}\text{C}$  y pH 8, determinadas en trabajos previos realizados en *el área de Ingeniería Química*.

Procedimiento: 100 mL de agua se introducen en un Erlenmeyer y se llevan a la temperatura de trabajo en un baño termostatzado. Seguidamente, se añaden 16g de FF junto con la enzima correspondiente. A continuación, se enciende la agitación magnética y se da por comenzada la cinética de hidrólisis. El seguimiento de la hidrólisis de proteína soluble se realizó mediante la toma de muestras a diferentes tiempos, las cuales, se han de hervir durante 10 minutos tras su extracción para inactivar la enzima.

Las muestras hidrolizadas se enfrían en baño de hielo, se centrifugan, se filtran y se almacenan en congelador a  $-21^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

## 3.4 Determinación de proteínas en disolución. Métodos analíticos

### 3.4.1 Método de Lowry

El ensayo de determinación de proteínas Lowry se basa en la reacción del Biuret (Shen, 2019) con pasos y reactivos adicionales para aumentar la sensibilidad de detección. Lowry añade ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico, conocido como reactivo Folin-Ciocalteu. Este reactivo interactúa con los iones cuprosos y las cadenas laterales de tirosina, triptófano y cisteína para producir un color azul verdoso que se detecta a 750 nm. El rango de detección de proteínas es de 5 a 100  $\mu\text{g}$ .

Materiales y equipos: balanza analítica, vidrio de reloj, matraces aforados, viales con tapa de rosca, puntas de micropipeta, micropipetas automáticas, espectrofotómetro (Thermoscientific Genesys 50) y cubeta de cuarzo.

Reactivos: 1) Reactivo Lowry: tartrato de potasio-sodio ( $\text{NaK}(\text{COO})_2(\text{CHOH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) [2%] en agua destilada, sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) [2%] en agua destilada y carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) [2%] en NaOH [0.1M]. 2) Reactivo de Folin: reactivo Folin-Ciocalteu diluido [1:3].

Procedimiento: El calibrado se ha realizado por el departamento de Ingeniería Química con la proteína seroalbúmina bovina (BSA) de Sigma-Aldrich en  $\text{CuSO}_4$  al [2%].

Dilución de las muestras previamente centrifugadas y filtradas con filtro de jeringa de 0.45  $\mu\text{m}$ , para que entren en el calibrado. Se toma 1 mL de cada muestra diluida en un vial, por duplicado, además de los blancos.

Se prepara el 1) reactivo de Lowry mezclando los 3 reactivos indicados anteriormente según la relación [1:1:100], se añaden 5 mL y se mantiene 15 minutos en oscuridad. A continuación, se añaden 0.5 mL de 2) reactivo Folin diluido y se mantiene 30 minutos en oscuridad. Finalmente, se mide la absorbancia de las muestras a  $\lambda = 750 \text{ nm}$  (LOWRY et al., 1951).

Los resultados se expresan en % proteína soluble.

## 3.5 Análisis de aminoácidos libres

### 3.5.1 Método de la Ninhidrina

Aplicando el método de la Ninhidrina se contabiliza el total de aminoácidos hidrolizados en cada muestra: extracto de proteína soluble, productos de la hidrólisis con agua subcrítica y productos de la hidrólisis enzimática mediante la determinación de la concentración de aminoácidos, aminos primarias y secundarias en disoluciones acuosas.

La Ninhidrina, hidrato de tricetohidrindeno, es un agente reactivo que reacciona con  $\alpha$ -aminoácidos cuyo pH se encuentra entre 4-8, formando un compuesto de coloración azul o violeta, aunque el color es variable según el aminoácido con el que reaccione.

La cuantificación de aminoácidos se evalúa midiendo espectrofotométricamente la absorbancia con longitud de onda de 570 nm, donde presenta un máximo de absorción. La medida es proporcional a la concentración de aminoácidos de la muestra.

Materiales y equipos: Tubos de ensayo roscados con tapón, gradilla para tubos de ensayo, puntas de micropipeta, micropipetas automáticas, agitador vórtex, atmósfera de N<sub>2</sub>, campana extractora, baño termostatzado, espectrofotómetro y cubeta de cuarzo.

Reactivos: 1) Ninhydrin Reagent Solution (2%): es una solución comercial de Ninhidrina e hidrindantina en dimetil sulfóxido (DMSO) con tampón de acetato de litio a pH 5.2 de Sigma-Aldrich, 2) etanol 95%.

Procedimiento: Se realiza el calibrado con el aminoácido mayoritario de la muestra a analizar, en este caso Leucina. Las soluciones de aminoácido se preparan en ácido acético glacial 0.05% a diferentes concentraciones.

Dilución de las muestras previamente centrifugadas y filtradas con filtro de jeringa de 0.45  $\mu$ m, para que entren en el calibrado. Se toma 2 mL de cada muestra diluida en un tubo de ensayo con rosca, por duplicado, además de los blancos. Añadir 1 mL de Ninhidrina bajo atmósfera de nitrógeno, ya que este reactivo es muy sensible al aire y se oxida rápidamente pasando a un color amarillento. La atmósfera de nitrógeno se consigue introduciendo nitrógeno por un tubo dentro del reactivo mientras éste está abierto. Se debe de trabajar dentro de la campana extractora.

Agitar para mezclar el contenido de los tubos en el vórtex. Incubar en baño con agua hirviendo durante 10 minutos. Enfriar, añadir 5 mL de etanol 95% en cada tubo y mezclar en el vórtex. Medir la absorbancia a  $\lambda = 570$  nm. (Friedman, 2004)

Los resultados se expresan en equivalentes de Leucina liberados/L y en grado de hidrólisis. Grado de hidrólisis, GH:

$$GH(\%) = \frac{h}{h_{tot}} \cdot 100 \quad [1]$$

Donde,  $h$  es el número de enlaces peptídicos equivalentes hidrolizados, expresados como mili equivalentes de proteína/g y  $h_{tot}$  es la cantidad total de milimoles de aminoácidos individuales por gramo en la proteína no hidrolizada que se puede evaluar a partir del perfil de aminoácidos de la materia prima (Trigueros et al., 2021).

### 3.5.2 Cromatografía de gases

Mediante la cromatografía de gases se caracterizan los aminoácidos hidrolizados en cada muestra: extracto de proteína soluble, productos de la hidrólisis con agua subcrítica y productos de la hidrólisis enzimática siguiendo el método comercial EZ:faast™ suministrado por Phenomenex®. (Badawy et al., 2008)

El procedimiento EZ:faast™ de análisis de aminoácidos consiste en una extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction, SPE) seguida de una derivatización y extracción líquido-líquido. (Mustafa et al., 2007)

Las muestras derivatizadas y encapsuladas se analizan por cromatografía de gases mediante GC-FID (Hewlett-Packard HP 6890 Series GC System) equipado con un detector de ionización de llama (FID), una columna capilar helicoidal Zebron ZB-AAA de 10 m × 0.25 mm (Phenomenex) y un inyector automático de la serie Agilent Technologies 7683B.

Para evaluar la hidrólisis total de la proteína y obtener el perfil completo de aminoácidos presentes se realiza una hidrólisis química en medio ácido.

Se añaden 0.1 mL de proteína soluble en un tubo roscado y se adiciona 1 mL de HCl 6M. Seguidamente, se incuba la mezcla durante 1 hora en un baño de agua hirviendo, después se mantiene 22 h en estufa a 100 °C. Las muestras deberán tener un pH entre 1.5 y 5.0, de no ser así se neutralizarán con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Finalmente, se filtran las muestras se analizan en mediante cromatografía de gases.

## 3.6 Distribución de pesos moleculares en los hidrolizados proteicos

### 3.6.1 Cromatografía de exclusión por tamaño molecular

Los pesos moleculares promedio en peso (Mw) y la polidispersidad de las muestras se determinaron empleando cromatografía de exclusión por tamaño de alta presión acoplada a detector de índice de refracción (HPSEC-RID).

El sistema HPLC 1260 (Agilent Technologies, CA, EE. UU.) consiste en una precolumna PL Aquagel conectada en serie con columnas PL Aquagel-OH 30, PL Aquagel-OH 40 de Agilent Technologies (300 mm x 7.5 mm, tamaño de partícula 8 µm). La caracterización de los hidrolizados de proteína se realizó a 40 °C y 60 µL de cada muestra se eluyeron en modo isocrático con NH<sub>4</sub>Ac 0.01M, a una velocidad de flujo de 0.7 mL/min. Además, se utilizó un estándar de calibrado PEO/PEG (P-219.990 – P-0.106 KDa) para la calibración y los datos se analizaron con el software Agilent OpenLab Data Analysis 2.5. Los estándares y las muestras se filtraron a través de filtros de jeringa de 0.45 µm.

## 3.7 Actividad antioxidante

### 3.7.1 Ensayo FRAP

El ensayo FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) evalúa la potencia antioxidante mediante la reducción de iones férricos a iones ferrosos a pH ácido formándose un complejo coloreado de tripiriditriazina ferrosa.

Se determina el poder reductor de las muestras, basado en la capacidad de reducir el Fe (III) hasta Fe (II), mediante la reacción: Fe (III)-TPTZ + 1 e<sup>-</sup> (incolore) → Fe (II)- TPTZ (azul). La

medida espectrofotométrica a  $\lambda=593$  nm es proporcional a la capacidad reductora de la muestra. (Benzie & Strain, 1996)

Materiales y equipos: viales de vidrio con tapa de rosca, puntas de micropipeta, micropipetas automáticas, baño termostatzado, espectrofotómetro (Thermoscientific Genesys 50) y cubeta de cuarzo.

Reactivos: 1) Tampón acetato sódico 0.3 M a pH 3.6 (base: 50 mL acetato de sodio 0.3 M + ácido: 500 mL ácido acético 0.3 M). Sobre 30 mL de base se va adicionando ácido hasta ajustar a 3.6 el pH. 2) TPTZ 10 mM: (2,4,6-tris.2-piridil-s-triazine) de Sigma-Aldrich disuelto en 10 mL de HCl 40 mM. 3) 10 mL  $\text{FeCl}_3$  20 mM.

Procedimiento: Se realiza el calibrado con sulfato de hierro (II) en agua como patrón en las mismas condiciones que las muestras.

Centrifugar y filtrar las muestras con filtro de jeringa de 0.45  $\mu\text{m}$ , para que entren en el calibrado. Se toman 90  $\mu\text{L}$  de cada muestra en un vial, por duplicado, además de los blancos. Se prepara el reactivo FRAP en un frasco topacio mezclando los 3 reactivos indicados anteriormente según la relación [25:2.5:2.5] más 3 mL agua Mili-Q. Se adicionan 2910  $\mu\text{L}$  de reactivo FRAP y se incuban durante 30 minutos a 37°C en baño de agua. Finalmente, se mide la absorbancia de las muestras a  $\lambda= 593$  nm.

Los resultados se expresan en  $\text{mM Fe}^{2+}/\text{g}_{\text{proteína soluble}}$ .

## 4. Resultados y discusión

---

### 4.1 Extracción de proteína soluble

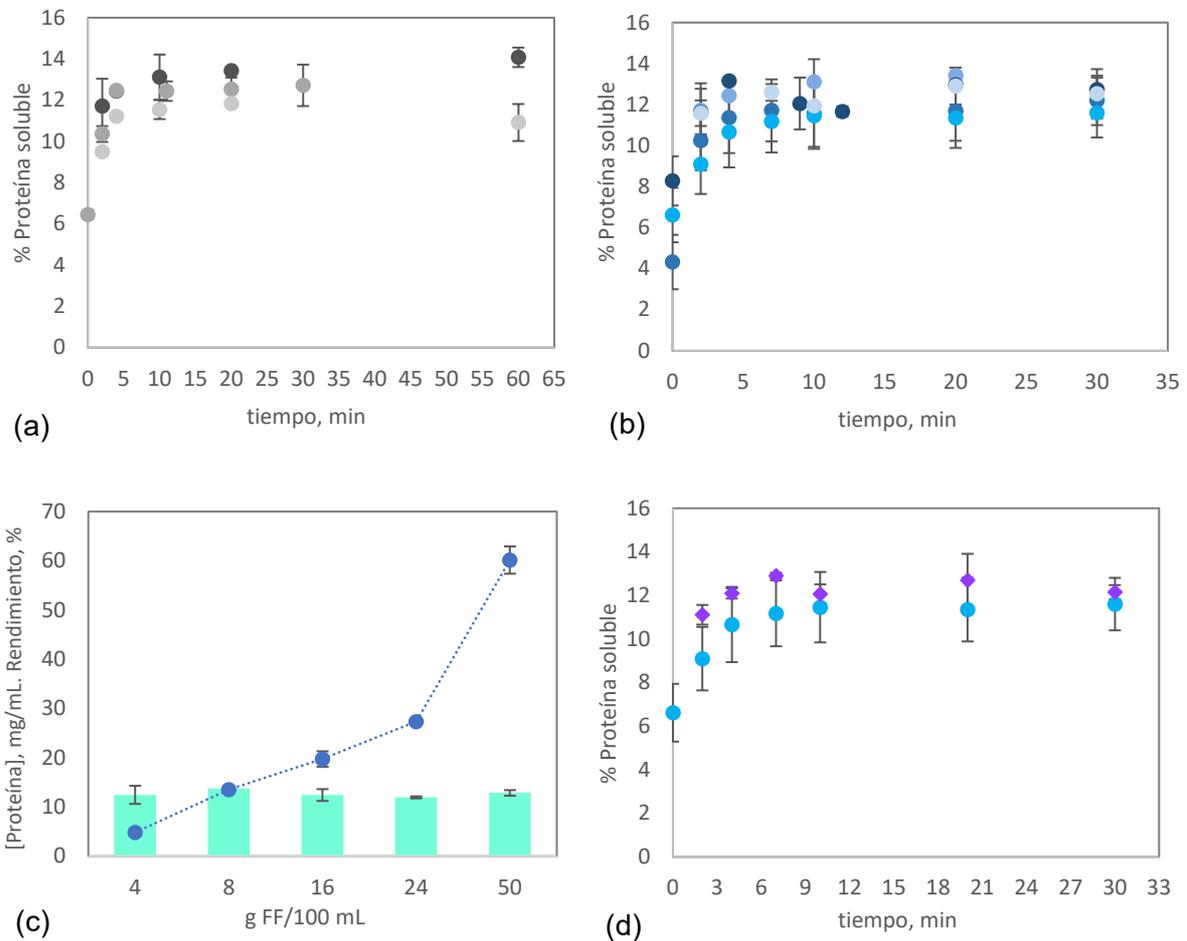
En el *Gráfico 1a* se presentan los resultados de extracción de proteína soluble a diferentes temperaturas y diferentes relaciones harina/disolvente. Se observa, que, al aumentar la temperatura, aumenta la velocidad inicial de extracción, con valores de  $3.67 \pm 0.01$ ,  $3.9 \pm 0.1$  y  $4.5 \pm 0.5$  mg/mLmin a 20, 50 y 80 °C, respectivamente. Además, el rendimiento final de extracción es ligeramente superior a la mayor temperatura estudiada, 80 °C. Por lo tanto, se seleccionó la temperatura de 80 °C para la extracción de proteína soluble.

En el *Gráfico 1b*, se determina que la mejor proporción para la extracción de proteína soluble en FF es de 16 g de FF en 100 mL de agua destilada con un valor a tiempo final de  $124.3 \pm 0.6$  mg de proteína soluble /g FF seca. Lo cual, supone un 24.4 % de proteína soluble respecto al contenido en proteína total de la harina.

En el *Gráfico 1c*, se representan los rendimientos finales para las diferentes relaciones sólido:disolvente, así como la concentración final de proteína soluble en el extracto. No hay diferencias en el rendimiento final de proteína soluble a pesar de que relaciones más bajas conducen a mayores fuerzas impulsoras. Si se observa un aumento claro de la concentración de proteína soluble en el extracto al aumentar la relación sólido:disolvente. Sin embargo, se eligió la relación 16 g de FF/100 mL, ya que en las dos proporciones mayores la separación del extracto y de la harina mediante centrifugación no fue adecuada debido a la gran cantidad de sólido y densidad del mismo.

También, se realiza extracto de proteína soluble con la DFF en las mismas condiciones con un valor similar al obtenido con FF, *Gráfico 1d*. Para DFF, las velocidades iniciales de

extracción son ligeramente superiores; sin bien, el rendimiento final fue del mismo orden. Por ello, para realizar los estudios de hidrólisis en agua subcrítica y enzimáticos se eligió el extracto de proteína con grasa. Aunque, para las condiciones óptimas de hidrólisis encontradas se realizó una experiencia con el extracto de harina desengrasada para comparar resultados.



**Gráfico 1.** (a) Cinéticas de extracción de proteína soluble a diferentes temperaturas: ● 80 °C, ● 50 °C y ● 20 °C con 16 g FF/100 mL de agua. (b) Cinéticas de extracción de proteína soluble a diferentes concentraciones FF/agua: ● 50g FF/100 mL ● 24g FF/100 mL ● 16g FF/100 mL ● 8g FF/100 mL ● 4g FF/100 mL (c) ● Rendimiento de extracción a diferentes concentraciones: ● 50, 24, 16, 8 y 4g FF/100 mL. (d) Comparación de la extracción con ● DFF respecto ● FF en condiciones óptimas. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar ( $n=3$ ).

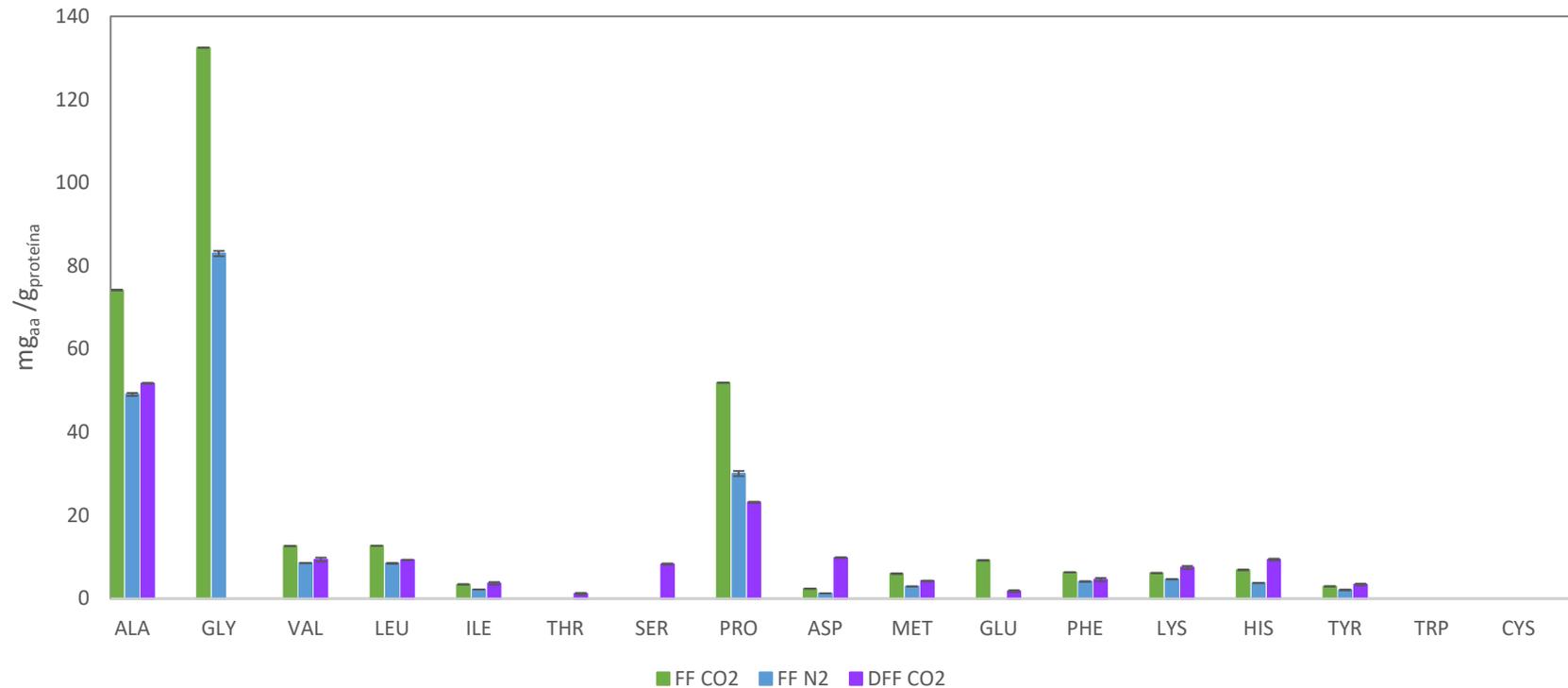
Se ha determinado el perfil de aminoácidos de la fracción proteica soluble en agua en la *Tabla 2*. El cual, difiere del perfil de aminoácidos de la fracción proteica total de FF en contenido.

La fracción proteica total de FF presenta como aminoácidos mayoritarios: GLU, ASP y ALA. En cambio, en el extracto de proteína soluble se han liberado como aminoácidos mayoritarios: GLY, PRO y GLU.

**Tabla 2.** Contenido de aminoácidos en la proteína de la harina, FF y el extracto de proteína soluble, PS expresados en mg<sub>aminoácido</sub>/g<sub>proteína</sub>

AA	ALA	GLY	VAL	LEU	ILE	THR	SER	PRO	ASP	MET	GLU	PHE	LYS	HIS	TYR	TRP	CYS
FF	76 ± 16	72 ± 11	43 ± 4	61 ± 5	35 ± 3	29 ± 2	20 ± 4	53 ± 8	81 ± 6	24 ± 4	104 ± 14	29 ± 2	56 ± 6	18 ± 2	19 ± 1	9 ± 2	76 ± 16
PS	85 ± 6	198 ± 6	35 ± 5	36 ± 1	20 ± 1	31 ± 1	34 ± 4	113 ± 7	73 ± 6	14 ± 1	92 ± 25	21 ± 2	36 ± 5	29 ± 2	14 ± 1	52 ± 4	24 ± 2

AA: aminoácido, FF: harina de pescado, PS: proteína soluble



**Gráfico 2.** Hidrólisis con sCW de extracto de proteína soluble FF y DFF en condiciones óptimas de temperatura, 180°C. Los resultados están expresados como la media ± la desviación estándar (n=3). Los aminoácidos que no aparecen no estaban comprendidos en el calibrado.

## 4.2 Métodos analíticos, grado de hidrólisis de la proteína soluble y contenido en aminoácidos libres.

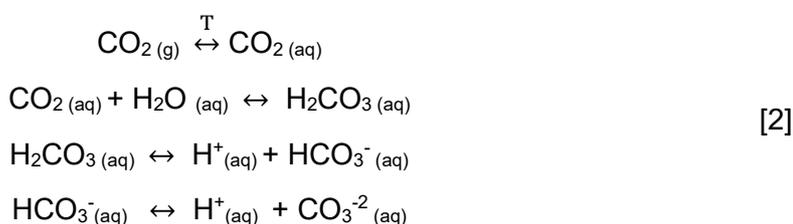
### 4.2.1 Hidrólisis con agua subcrítica (sCW)

Se ha realizado la hidrólisis de la fracción proteica soluble a tres temperaturas diferentes, 140, 160 y 180 °C, empleando inicialmente N<sub>2</sub> como gas inerte para presurizar. En el *Gráfico 4a* se muestran los equivalentes de Lecuina/L liberados, mientras que en el *Gráfico 4c* se muestra el grado de hidrólisis, calculado a partir de los equivalentes de leucina liberada y el perfil de aminoácidos de la fracción de proteína soluble con la *Tabla 2 y ecuación 1*. Se comprueba que, al aumentar la temperatura, el grado de hidrólisis aumenta; esto es debido a las propiedades del agua subcrítica con la temperatura. El producto iónico aumenta, lo cual genera pH más ácidos en el medio que hacen aumentar su poder hidrolítico sin necesidad de añadir catalizador adicional al medio.

Propiedades a las condiciones de trabajo:

T, °C	140	160	180
pK <sub>w</sub>	11.667	11.472	11.331
pH	5.834	5.736	5.665

También, se realizó la hidrólisis en agua subcrítica presurizada con CO<sub>2</sub> para analizar el posible efecto hidrolítico del CO<sub>2</sub> en el medio. Debido a su gran solubilización y la correspondiente formación de ácido carbónico tras sus equilibrios de conversión como se puede ver en la *ecuación 2*. El CO<sub>2</sub> libera protones al seno de reacción. Los cuales, podrían ejercer de catalizadores de la hidrólisis.



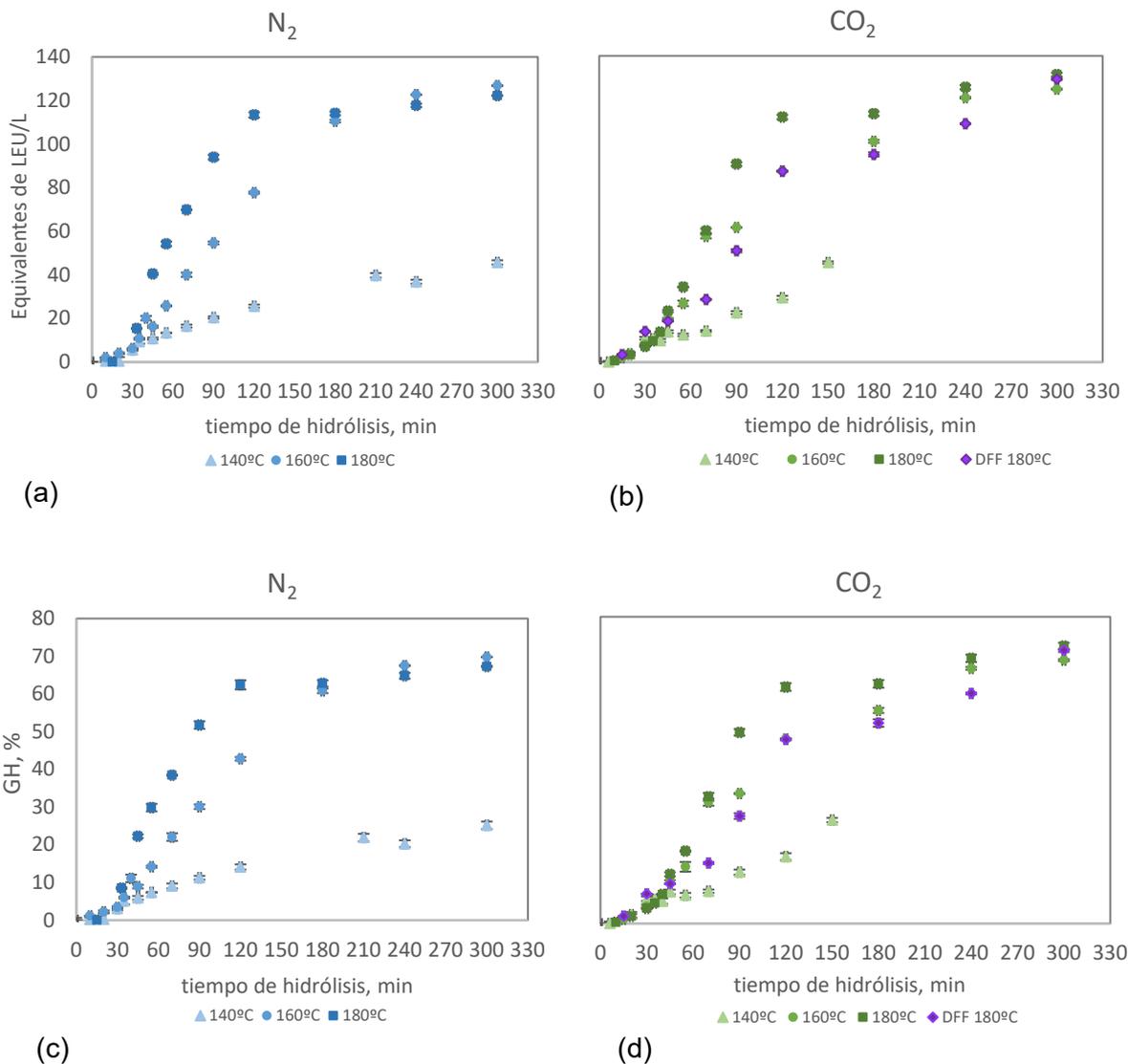
Tras realizar el análisis de la Ninhidrina, no se observan diferencias entre ambos gases *Gráfico 4*. Por lo que los protones del CO<sub>2</sub> estarían en baja proporción, o no actuarían como catalizadores.

Para determinar el contenido en aminoácidos libres de las muestras finales, se llevó a cabo el análisis mediante cromatografía de gases para las hidrólisis realizadas a 180 °C tanto con CO<sub>2</sub> como con N<sub>2</sub> *Gráfico 2*.

En la hidrólisis con sCW de la proteína soluble FF si se observa un mayor contenido en aminoácidos libres empleado CO<sub>2</sub>, sobretodo en la determinación de ALA, GLY y PRO. Ya que con N<sub>2</sub> la determinación de estos aminoácidos es 3 inferior como se observa en el *Gráfico 2*. Por lo tanto, el método de Ninhidrina ha sido útil a nivel cualitativo para analizar el efecto de la temperatura; si bien, no ha sido capaz de correlacionar de forma adecuada el contenido en aminoácidos libres determinados por cromatografía de gases. Ya que el método no sólo detecta aminoácidos libres, si no también aminas primeras y secundarias.

Según los mejores resultados en términos de aminoácidos libres para la hidrólisis con sCW con CO<sub>2</sub>, se realizó una última experiencia a 180°C empelando el extracto de proteína soluble

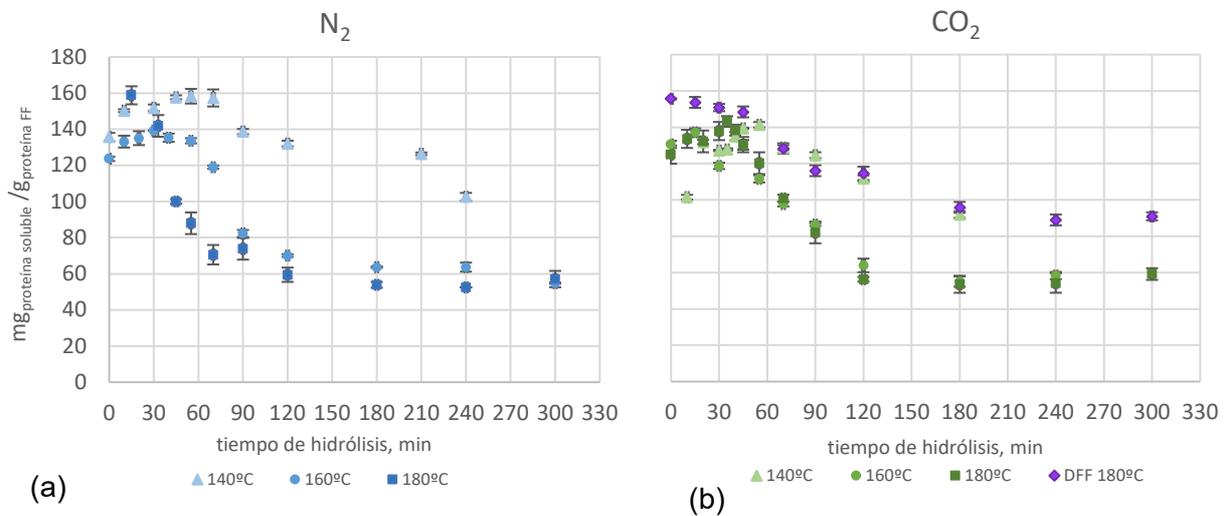
DFF *Gráfica 4b y 4d*. En esta experiencia, se observaron rendimientos ligeramente inferiores a los obtenidos para el extracto con FF; sin embargo, hubo problemas con la sonda de temperatura del equipo, por lo que los resultados no son concluyentes y habría que repetir la experiencia con una sonda nueva. Este menor grado de hidrólisis también se observa en el perfil de aminoácidos libres del extracto de proteína soluble de DFF *Gráfico 2*. Cabe destacar que los aminoácidos ASP, HIS y LYS se hidrolizan más en extracto proteico DFF. Además, el contenido en GLY era superior a  $140 \text{ mg}_{\text{aa}}/\text{g}_{\text{proteína}}$ , por lo que no se recoge en el *Gráfico 2*. Cuando se sustituya la sonda de temperatura, se repetirá la experiencia. Aunque no se esperan resultados muy diferentes a los obtenidos con el extracto de proteína DFF.



**Gráfico 4.** Aminoácidos totales libres en hidrólisis con sCW. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar ( $n=3$ ).

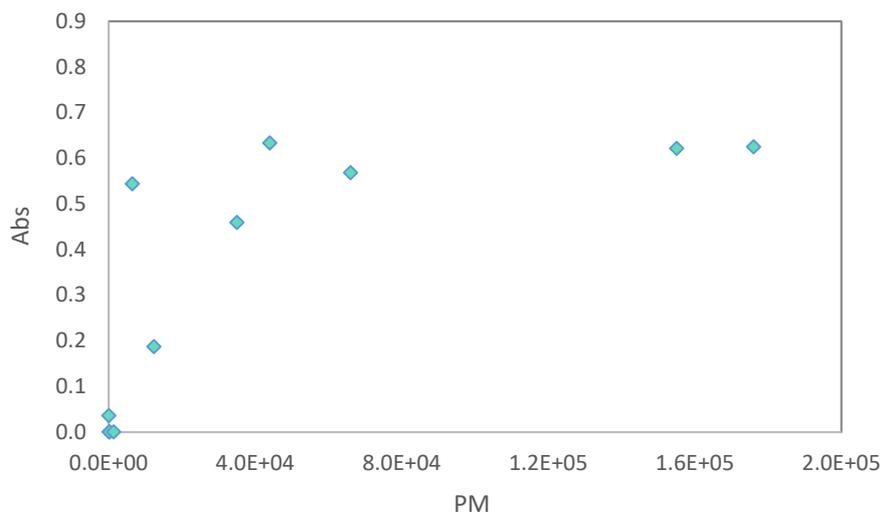
Para todas las experiencias realizadas se determinó el contenido de proteína en el medio mediante el ensayo de Lowry, tanto con N<sub>2</sub> *Gráfico 5a* como con CO<sub>2</sub> *Gráfico 5b*. Se observa una tendencia decreciente del contenido de proteína con el tiempo, ya que el reactivo de Folin

reacciona con proteínas intactas; sin embargo, no reacciona con aminoácidos libres. Por lo que se ve que cada vez quedaban menos proteínas, debido a el proceso de hidrólisis a péptidos más pequeños y a aminoácidos.



**Gráfico 5.** Cantidad de proteína hidrolizada en sCW con  $N_2$  y  $CO_2$ . Los resultados están expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar ( $n=3$ ).

Para comprobarlo se preparó una mezcla sintética de aminoácidos comerciales a una concentración similar a la encontrada para la experiencia a 180°C con  $CO_2$ , **Gráfico 6**. Se comprobó que el reactivo de Folin no reaccionaba con los aminoácidos libres. Porque la reacción es lenta y la respuesta del ensayo depende del tamaño e la proteína y la composición de aminoácidos. La intensidad del color en la técnica espectrofotométrica aumenta con el tamaño del péptido (Noble & Bailey, 2009). Además, la respuesta también depende del tamaño de la proteína y de su composición. Esta tendencia se puede observar en el **Gráfico 6**, donde para diferentes patrones de proteína y péptidos comerciales la formación de color aumenta con el tamaño molecular hasta un peso molecular medio en torno a 40 kDa.

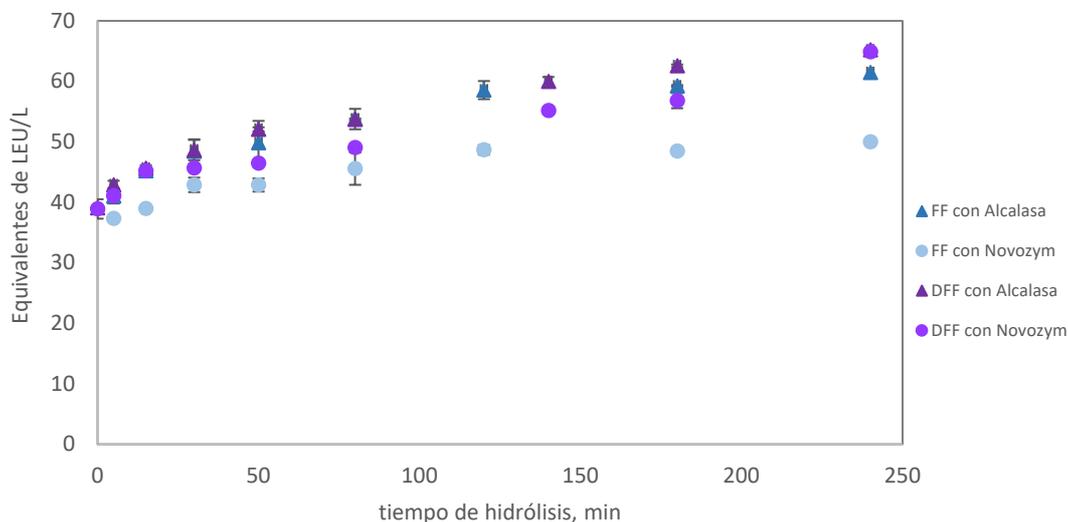


**Gráfico 6.** Diferentes mezclas sintéticas de diferentes composiciones a una concentración de 0.2 mg/mL.

## 4.2.2 Hidrólisis enzimática

Para comparar los resultados obtenidos en la hidrólisis con sCW se han realizado dos hidrólisis enzimáticas con las enzimas comerciales Alcalasa y Novozym. El grado de hidrólisis, referido en equivalentes de Leucina/L obtenidos mediante el método de la Ninhidrina, se muestra en el *Gráfico 7*. Donde se observa que Alcalasa es la que mayor rendimiento presenta, de acuerdo con (Hrčková et al., 2018). Aunque, en el último punto casi se igualan Alcalasa y Novozym en el extracto de proteína soluble DFF. Con unos valores de  $65.2 \pm 0.2$  y  $64.9 \pm 0.4$  Equivalentes LEU/L, respectivamente.

Se observa que la hidrólisis enzimática presenta un rendimiento inferior a la hidrólisis con sCW. Mediante la hidrólisis con sCW se llega a un 70% de GH mientras que con la hidrólisis enzimática sólo se llega a un 35% de GH. Aunque lo más probable es que los GH de ambas hidrólisis sean inferiores, puesto que, el método de la Ninhidrina no sólo detecta aminoácidos libres, si no también aminas primarias y secundarias.



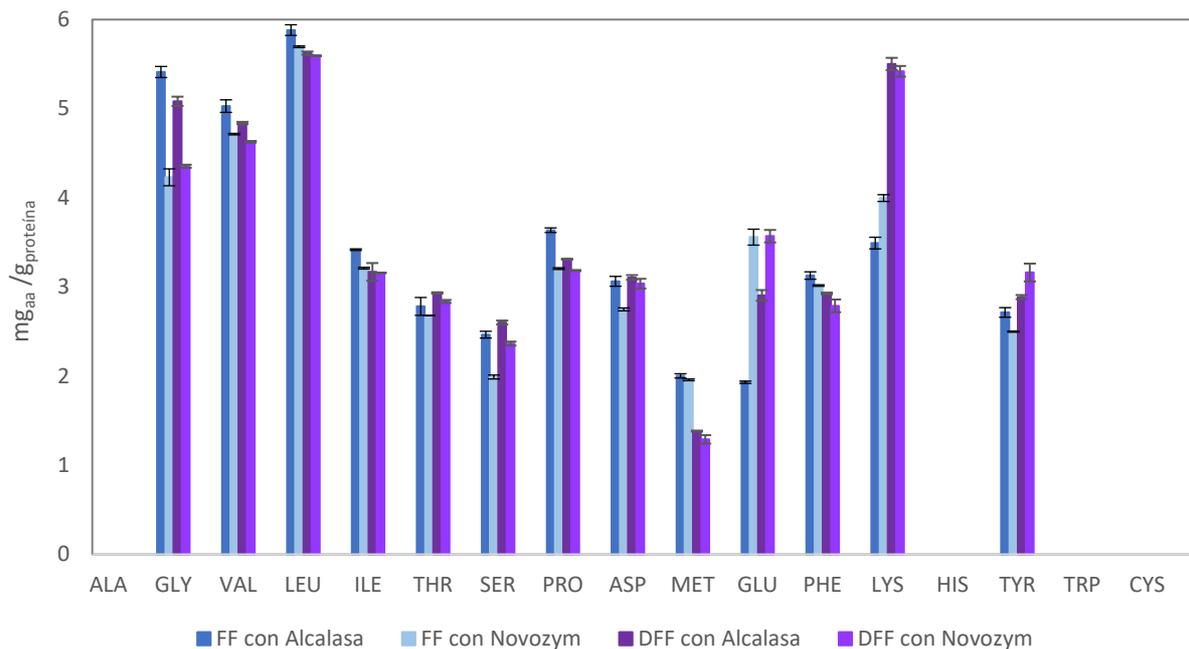
*Gráfico 7. Aminoácidos totales libres en hidrólisis enzimática. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar (n=3).*

También, se ha determinado para todos los puntos finales de hidrólisis enzimática, tanto del extracto de FF como para DFF el perfil de aminoácidos libres generado en el medio de reacción, *Gráfico 8*.

En el *Gráfico 8* la hidrólisis enzimática con extracto de proteína soluble FF, es superior la hidrólisis con Alcalasa. Además, los aminoácidos mayoritarios corresponden con los determinados con Novozym: LEU, GLY y VAL. Aunque Novozym detecta mejor a: GLU y LYS.

Para la hidrólisis enzimática con extracto de proteína soluble DFF, es ligeramente superior la hidrólisis con Alcalasa. Además, los aminoácidos mayoritarios corresponden con los determinados con Novozym: LEU, LYS y VAL. Aunque Novozym detecta mejor a: GLU y TYR.

(Ghaly, 2013) informa que hay residuos muy sensibles que son difíciles de detectar. Por lo que, por ejemplo, Novozym ha detectado de una forma más específica el residuo GLU. Y Alcalasa el residuo GLY. Por lo que, el empleo de una enzima u otra depende de la especificidad que se esté buscado, como en todas las técnicas analíticas no hay una universal.



**Gráfico 8.** Perfil de aminoácidos libres en hidrólisis enzimática. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar ( $n=3$ ). Los aminoácidos que no aparecen no estaban comprendidos en el calibrado.

El contenido en aminoácidos libres para todas las experiencias de hidrólisis enzimáticas es muy inferior al contenido en aminoácidos libres obtenido de la hidrólisis con sCW. De tal forma que, para la hidrólisis enzimática a tiempo final con Alcalasa FF se obtienen un total de aminoácidos libres de  $45.0 \pm 0.6$  mg<sub>aa</sub>/g<sub>proteína</sub>, con Alcalasa DFF  $46.3 \pm 0.4$  mg<sub>aa</sub>/g<sub>proteína</sub>, con Novozym FF  $43.5 \pm 0.3$  mg<sub>aa</sub>/g<sub>proteína</sub>, y con Novozym DFF  $45.4 \pm 0.5$  mg<sub>aa</sub>/g<sub>proteína</sub>.

En cambio, para la hidrólisis con sCW a 180°C a tiempo final con CO<sub>2</sub> FF se obtiene el máximo valor de  $327.08 \pm 0.3$  mg<sub>aa</sub>/g<sub>proteína</sub>, con N<sub>2</sub> FF se obtiene menor cantidad,  $200.01 \pm 0.9$  mg<sub>aa</sub>/g<sub>proteína</sub> y finalmente con CO<sub>2</sub> DFF se obtiene un valor de  $147.4 \pm 0.8$  mg<sub>aa</sub>/g<sub>proteína</sub>. Pero, como ya se ha comentado anteriormente, este valor podría ser ligeramente distinto, aunque no mucho más, debido a que se debe repetir con una sonda nueva.

### 4.3 Distribución de pesos moleculares en los hidrolizados proteicos

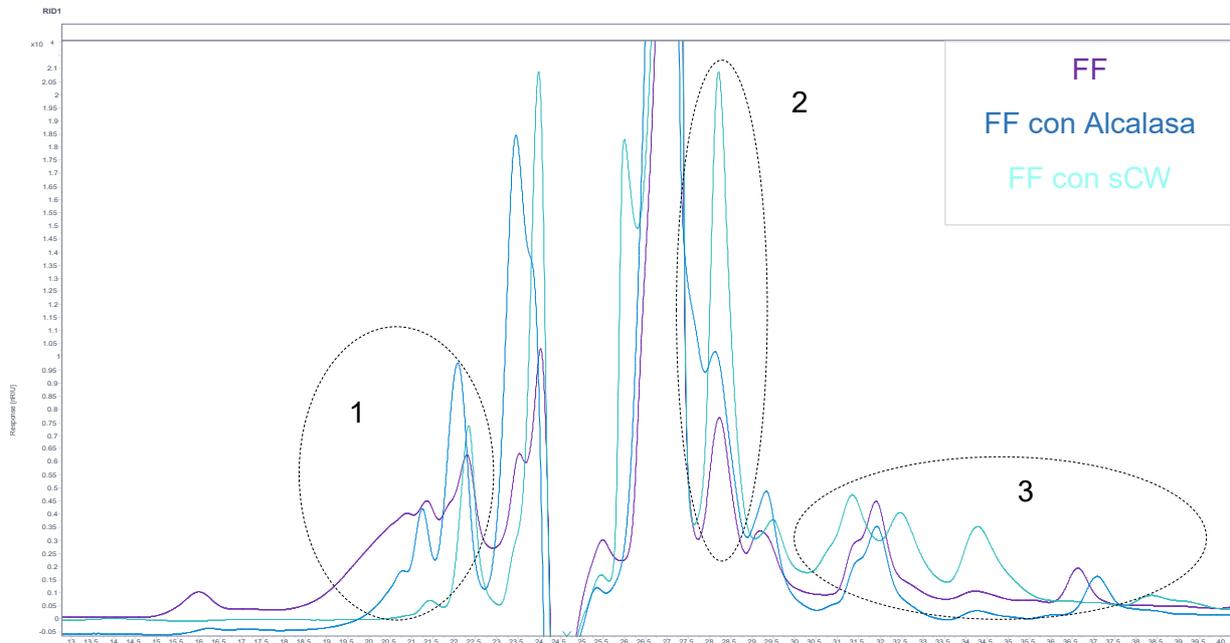
Se ha realizado cromatografía por exclusión de tamaño a nivel cualitativo, para observar los efectos de las hidrólisis con sCW y enzimática respecto al extracto de proteína soluble inicial FF. Puesto que, entre los extractos de proteína soluble FF y DFF no se encontraron diferencias.

En la *Tabla 3* se hace una distinción por grupos de picos de los puntos de elución más significativos de las hidrólisis respecto al extracto proteico.

Como se puede observar en el *Gráfico 9* el **grupo 1** contiene los péptidos más grandes con un tamaño superior a 17 kDa ya que es el que menor tiempo de elución presenta. Como era de esperar, el extracto de proteína soluble es el que contiene mayor cantidad de péptidos grandes. A continuación, la hidrólisis enzimática con Alcalasa. Y finalmente, la hidrólisis con sCW es la que presenta la menor cantidad de péptidos grandes.

El **grupo 2** contiene péptidos intermedios, en el *Gráfico 9* se observa un claro ejemplo de que la hidrólisis con sCW es mucho más efectiva que la hidrólisis enzimática. Al igual que en el **grupo 3**, donde también se observa un gran efecto de la hidrólisis con sCW, ya que presenta la mayor cantidad de péptidos pequeños y aminoácidos con un tamaño inferior a 0.1 kDa como recoge la *Tabla 3*.

Finalmente, este análisis ha servido para constatar que la hidrólisis con sCW presenta un rendimiento hidrolítico superior al enzimático, como veníamos viendo.



**Gráfico 9.** Distribución de pesos moleculares en los hidrolizados respecto proteína soluble inicial.

**Tabla 3.** Resumen de pesos moleculares en extracto de proteína soluble e hidrolizados. El calibrado del tamaño de los péptidos comprende: (0.1, 200) kDa por lo que todo lo que queda fuera se excluye.

Grupo	Muestra	Tiempo de elución (min)	Área (%)	Mw (kDa)
1	FF		22.26	
	FF con Alcalasa	< 22.50	11.70	> 17.00
	FF con sCW		3.88	
2	FF	28.22	7.61	0.48
	FF con Alcalasa	28.12	8.77	0.47
	FF con sCW	28.20	14.21	0.46
3	FF		5.74	
	FF con Alcalasa	> 30.50	6.12	< 0.1
	FF con sCW		16.32	

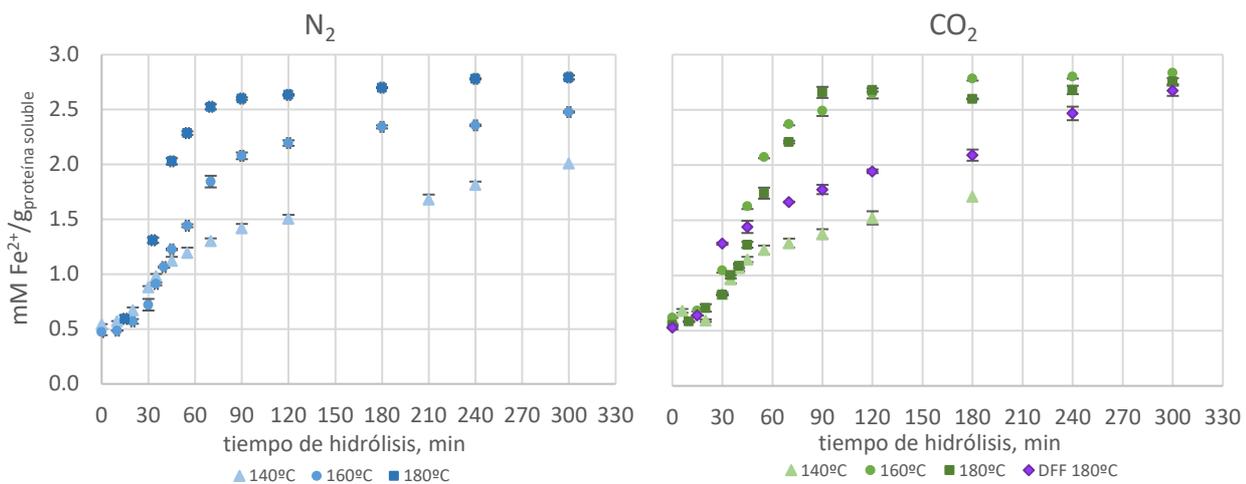
#### 4.4 Actividad antioxidante

Se probaron diferentes métodos para determinar la capacidad antioxidante, y se comprobó que el método FRAP era el único que daba resultados fiables. Puesto que en el método ABTS

(Re et al., 1999) la coloración del calibrado cambiaba mucho con el tiempo y los resultados eran inestables. Y en el método DPPH (Brand-Williams et al., 1995) se comprueba que la proteína no es soluble en metanol (disolvente del reactivo), por lo que la proteína precipita y no se puede cuantificar.

#### 4.4.1 Hidrólisis con agua subcrítica (sCW)

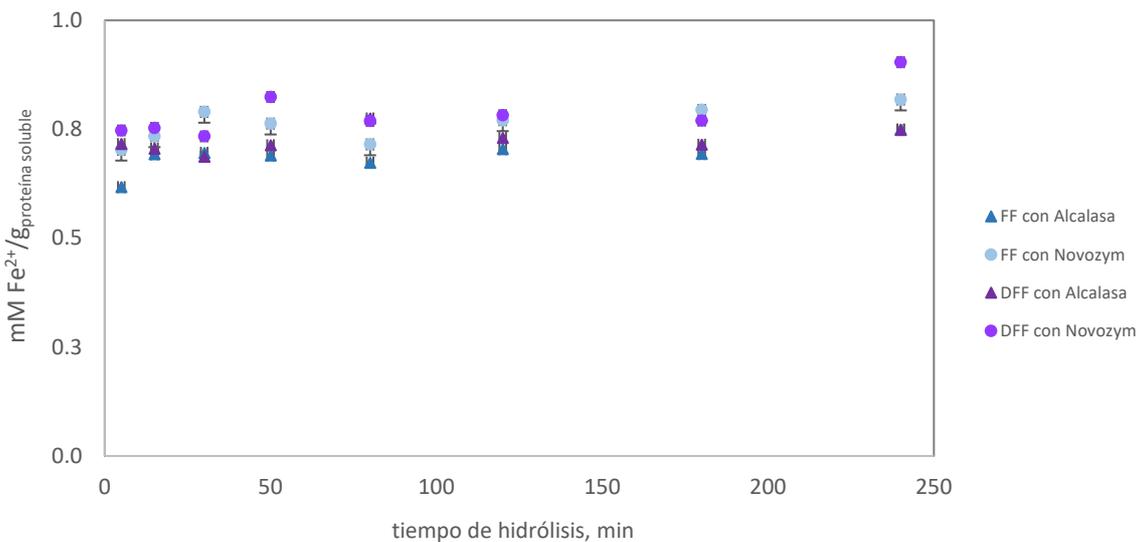
En el *Gráfico 10* se observa que, a mayor temperatura mayor capacidad reductora presentan los extractos finales. Empleando CO<sub>2</sub> las diferentes temperaturas casi convergen en una misma actividad antioxidante a tiempo final. En cambio, con el N<sub>2</sub> la temperatura mayor es la que presenta mayor capacidad reductora.



**Gráfico 10.** Capacidad reductora en las hidrólisis con sCW. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar ( $n=3$ ).

#### 4.4.2 Hidrólisis enzimática

En el *Gráfico 11* se observa que Novozym presenta mayor capacidad reductora que Alcalasa. Siendo superior el contenido de antioxidantes en la proteína soluble DFF hidrolizada como se puede ver en la *Tabla 4*.



**Gráfico 11.** Actividad antioxidante en las hidrólisis enzimáticas. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar ( $n=3$ ).

**Tabla 4.** Resumen de los resultados de actividad antioxidante a tiempo final. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  la desviación estándar (n=3).

	FRAP (mM Fe <sup>2+</sup> / g <sub>proteína soluble</sub> )
Extracto de proteína soluble, FF	0.569 $\pm$ 0.002
Extracto de proteína soluble, DFF	0.60 $\pm$ 0.01
Hidrólisis con sCW, N <sub>2</sub>	
140°C	2.01 $\pm$ 0.03
160°C	2.48 $\pm$ 0.01
180°C	2.79 $\pm$ 0.02
Hidrólisis con sCW, CO <sub>2</sub>	
140°C	1.71 $\pm$ 0.03
160°C	2.83 $\pm$ 0.02
180°C	2.76 $\pm$ 0.03
180°C, DFF	2.67 $\pm$ 0.02
Hidrólisis enzimática	
Alcalasa	0.75 $\pm$ 0.01
Novozym	0.82 $\pm$ 0.03
Alcalasa, DFF	0.78 $\pm$ 0.01
Novozym, DFF	0.90 $\pm$ 0.02

Una vez más, se comprueba que la hidrólisis con sCW es superior a la hidrólisis enzimática. Puesto que con la hidrólisis enzimática se obtienen capacidades antioxidantes inferiores.

Como se observa en la *Tabla 4*, la hidrólisis con sCW presenta mayor capacidad antioxidante, esto puede correlacionarse con los tamaños obtenidos de los hidrolizados mediante esta técnica en la cromatografía de exclusión molecular. Por lo que, a mayor grado de hidrólisis, mayor capacidad reductora. Y viceversa, para la hidrólisis enzimática se obtiene menor capacidad reductora debido a su menor grado de hidrólisis respecto sCW.

## 5. Conclusiones

---

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la hidrólisis con sCW es una tecnología verde mucho más efectiva que la hidrólisis enzimática.

En la hidrólisis con sCW no se han encontrado diferencias en el grado de hidrólisis entre los distintos gases de presurización, N<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> a priori. Si se ha observado que a mayor temperatura empleada mayor es la hidrólisis proteica que se produce. Se ha verificado en el perfil de aminoácidos libres que es más efectiva la hidrólisis de extracto proteico con grasa empleando como gas presurizante CO<sub>2</sub>.

En la hidrólisis enzimática se concluye que la hidrólisis con Alcalasa es ligeramente superior que con Novozym. Al contrario que en la actividad antioxidante, donde Novozym presenta mayor capacidad reductora.

Del análisis de distribución de pesos moleculares se obtienen los resultados esperados, se afirma que se produce mayor hidrólisis con sCW. Lo cual, está relacionado con mayor actividad antioxidante, los péptidos más pequeños presentan mayor capacidad reductora.

## 6. Bibliografía

---

- Akiya, N., & Savage, P. E. (2002). Roles of Water for Chemical Reactions in High-Temperature Water. *Chemical Reviews*, 102(8), 2725–2750. <https://doi.org/10.1021/CR000668W>
- Badawy, A. A. B., Morgan, C. J., & Turner, J. A. (2008). Application of the Phenomenex EZ:faast™ amino acid analysis kit for rapid gas-chromatographic determination of concentrations of plasma tryptophan and its brain uptake competitors. *Amino Acids*, 34(4), 587. <https://doi.org/10.1007/S00726-007-0012-7>
- Benzie, I. F. 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. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1996.0292>
- Blanco, M., Sotelo, C. G., Chapela, M. J., & Pérez-Martín, R. I. (2007). Towards sustainable and efficient use of fishery resources: present and future trends. *Trends in Food Science & Technology*, 18(1), 29–36. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2006.07.015>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Bucio, S. L., Sanz, M. T., Beltrán, S., Melgosa, R., Solaesa, Á. G., & Ruiz, M. O. (2016). Study of the influence of process parameters on liquid and supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oil from rendered materials: Fish meal and oil characterization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 270–277. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2015.09.019>
- Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, 135(4), 3020–3038. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.06.100>

- FAO. (2020). *World Fisheries and Aquaculture 2020*. 244 p.  
<http://www.fao.org/3/ca9229en/ca9229en.pdf>
- Ferreira, I. J. B., Alexandre, E. M. C., Saraiva, J. A., & Pintado, M. (2022). Green emerging extraction technologies to obtain high-quality vegetable oils from nuts: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 76, 102931. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2022.102931>
- Friedman, M. (2004). Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 385–406. <https://doi.org/10.1021/JF030490P>
- Ghaly, A. (2013). Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review. *Amino Acids and Oils: A Critical Review. J Microb Biochem Technol*, 5(4), 107–129. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000110>
- Gupta, M., Paul, S., & Gupta, R. (2010). General aspects of 12 basic principles of green chemistry with applications. In *Current Science* (Vol. 99, Issue 10, pp. 1341–1360).
- Hrčková, M., Rusňáková, M., & Zemanovič, J. (2018). Enzymatic hydrolysis of defatted soy flour by three different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Czech Journal of Food Sciences*, 20(No. 1), 7–14. <https://doi.org/10.17221/3503-CJFS>
- Khawli, F. Al, Pateiro, M., Domínguez, R., Lorenzo, J. M., Gullón, P., Kousoulaki, K., Ferrer, E., Berrada, H., & Barba, F. J. (2019). Innovative Green Technologies of Intensification for Valorization of Seafood and Their By-Products. *Marine Drugs 2019, Vol. 17, Page 689, 17*(12), 689. <https://doi.org/10.3390/MD17120689>
- Kim, S. K., & Mendis, E. (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. *Food Research International*, 39(4), 383–393. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2005.10.010>
- Lieder, M., & Rashid, A. (2016). Towards circular economy implementation: a comprehensive review in context of manufacturing industry. *Journal of Cleaner Production*, 115, 36–51. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2015.12.042>
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Mustafa, A., Aman, P., Andersson, R., & Kamal-Eldin, A. (2007). Analysis of free amino acids in cereal products. *Food Chemistry*, 105(1), 317–324. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.11.044>
- Ngo, D. H., Wijesekara, I., Vo, T. S., Van Ta, Q., & Kim, S. K. (2011). Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview. *Food Research International*, 44(2), 523–529. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2010.12.030>
- Noble, J. E., & Bailey, M. J. A. (2009). Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*, 463(C), 73–95. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63008-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1)
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

- Rubio-Rodríguez, N., de Diego, S. M., Beltrán, S., Jaime, I., Sanz, M. T., & Rovira, J. (2008). Supercritical fluid extraction of the omega-3 rich oil contained in hake (*Merluccius capensis*–*Merluccius paradoxus*) by-products: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(2), 215–226. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2008.07.007>
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2017). *Bioactive Peptides*. <https://academic.oup.com/jaoac/article/91/4/914/5656149>
- Shen, C.-H. (2019). Quantification and Analysis of Proteins. *Diagnostic Molecular Biology*, 187–214. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00008-0>
- Trigueros, E., Alonso-Riaño, P., Ramos, C., Diop, C. I. K., Beltrán, S., & Sanz, M. T. (2021). Kinetic study of the semi-continuous extraction/hydrolysis of the protein and polysaccharide fraction of the industrial solid residue from red macroalgae by subcritical water. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(6), 106768. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2021.106768>