



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TEXTIL**

**OBTENCIÓN DE SUBPRODUCTOS CON ELEVADO VALOR
AÑADIDO A PARTIR DE RESIDUOS DE PRODUCTOS
CÁRNICOS DESTINADOS AL CONSUMO HUMANO.**

**MIGUEL ANGULO VELA
SALAMANCA, 2021**



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TEXTIL**

**OBTENCIÓN DE SUBPRODUCTOS CON ELEVADO VALOR
AÑADIDO A PARTIR DE RESIDUOS DE PRODUCTOS
CÁRNICOS DESTINADOS AL CONSUMO HUMANO.**

**MEMORIA QUE PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIA Y
TECNOLOGÍA QUÍMICAS POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.
PRESENTA:**

D. MIGUEL ANGULO VELA.



La Dra. Dña. María del Carmen Márquez Moreno, Catedrática de Ingeniería Química de la Universidad de Salamanca,

INFORMA

Que la memoria titulada “Obtención de subproductos con elevado valor añadido a partir de Residuos de Productos Cárnicos destinados al consumo humano” presentada por D. Miguel Angulo Vela para optar al Grado de Doctor en Ciencia y Tecnología Química, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Ingeniería Química y Textil de la Universidad de Salamanca.

Que, considerando que dicho trabajo reúne los requisitos exigidos para ser presentado como tesis doctoral, expresa su conformidad con dicha presentación en la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firma el presente informe, en Salamanca a 31 de Agosto de 2021.

Fdo. M^a Carmen Márquez Moreno

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a **Dios**, ya que es Él, quien tiene escrito el destino de cada uno y la misión que tenemos que cumplir en este mundo.

Posteriormente quiero agradecer a todas aquellas personas que formaron parte de este recorrido, el cual hoy llega a su fin, es por ello que quiero iniciar mencionando a mi *Mamachita*: **Julia Carmen Vela Suarez**, gracias por ser mi madre y al empuje y a los buenos deseos de verme lograr un mérito tan importante, nunca dejo de creer en mí y pese a todas las adversidades siempre estuvo ahí para darme ánimos de no caer y seguir luchando; a mi *Papucho*: **Miguel Ángel Angulo Valera**, gracias por ser mi padre, que pese a la distancia no hubo día, ni ocasión que dejara pasar para darme sus sabias palabras que me hicieron ver la vida con otros ojos y matices; a mi *Amigo de corazón*: **Renato Neves Barreto**, gracias por apoyarme en los momentos que más necesitaba y sobre todo cuidar de mi mamá; a mi *Gochola*: **Andrea Angulo Vela**, gracias por ser mi hermana y por cuidar de papá, en todo este tiempo que no estuve allí, sé que siempre me llevas en tus pensamientos y corazón en todo instante; a mi *Esposa (29/01/2021)*: **Noelia Del Cerro Rebollo**, que a pesar de encontrarme en la parte final de este camino en donde necesite un apoyo, ella me lo brindo incondicionalmente, gracias por aguantarme tanto y amarme demasiado, te amo infinitamente; a mis *Niños*: **Antonio Angulo Del Cerro y Noel Angulo Del Cerro**, aprendí a valorar con ustedes cada detalle, momento y motivo, que solo pensamientos puros e inocentes pueden tener, gracias por recordarme que algún día yo también fui igual que ustedes.

De igual manera quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio que me acogieron con tanto cariño y desinteresadamente, ya que en ese momento lo único que les podía ofrecer era mi sincera amistad, gracias por integrarme y hacerme sentir que nunca estuve solo en el laboratorio.

Dedicarle esto también a una personita que en julio del 2005 partió de mi vida dejándome un vacío incalculable: a mi *Poperita*: **Henry Raygada Angulo**; gracias por ser mi hermano, un beso al cielo, esto también va por ti.

Gracias también a todas las Personas y Centros Académicos que hicieron que llegara a estas instancias, en especial: a la **Universidad Nacional de la Amazonia Peruana**, siendo esta mi Alma Mater desde el 2005; a la **Universidad de Santiago de Compostela**, la cual me bautizo en el 2010, en mi primer contacto como estudiante internacional; a la **Universidad de Granada**, quien me dio el título de Master en el 2016, el cual me permitió optar al Doctorado; a la **Universidad de Bologna**, la cual me dio la oportunidad el 2018, de realizar una breve estancia de investigación predoctoral en sus instalaciones; y por supuesto a la **Universidad de Salamanca**, siendo esta la que me recibió y cobijo desde Septiembre del 2014 en sus instalaciones y su ciudad, en donde no solo crecí académicamente sino también como persona, más aún en tiempos actuales, donde la pandemia (Covid-19) azota al mundo entero y la cual me tocó vivir de primera mano, en donde realmente te das cuenta del corazón e intenciones de los que te rodean y sobre todo deseando que nadie pase por esto porque no es plato de buen gusto. Esperando no estar olvidándome de nadie y si así fuera el caso pido mil disculpas ya que sobre todo y ante todo quiero decir a todos vosotros:

GRACIAS TOTALES.

“Con el tiempo, lo que hoy es difícil mañana será una conquista. Esfuérzate por lo que realmente te llena el alma. Y ten la virtud de saber esperar. Porque... todo lo que tiene que ser, será.”

*A una persona maravillosa, en todos los sentidos, la cual la tengo
como referente en
el ámbito académico y sobre
todo en el ámbito personal:
Dra. María del Carmen Márquez Moreno.
Eternamente Agradecido.*

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE	11
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	31
CAPÍTULO II: FUNDAMENTO TEÓRICO Y REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	45
1. Residuos de Origen Animal No Destinados al Consumo Humano	47
2.1.1. SANDACH	47
2.1.2. Residuos de carnicerías	50
2. Hidrolisis enzimática	55
2.2.1. Hidrólisis enzimática de proteínas	56
2.2.2. Hidrólisis enzimática de lípidos	60
3. Cinética enzimática	64
2.3.1. Cinética enzimática simple	64
1. Consideración de equilibrio rápido	67
2. Consideración de estado cuasi estacionario	69
2.3.2. Cinética enzimática compleja	69
2.3.2.1. Inhibición enzimática	69
2.3.2.2. Desactivación enzimática	73
2.4. Optimización del proceso enzimático	77
2.4.1. Análisis de superficies de respuesta	78
2.4.1.1. Fundamento matemático de las superficies de respuesta	78
2.4.1.2. Diseño de experimentos	81
2.4.2. Utilización de las superficies de respuesta en la optimización de la hidrólisis enzimática	84
CAPÍTULO III: OBJETIVOS	89
3. Objetivos	91
CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS	97
1. Metodología	99
2. Recogida y pretratamiento del sustrato	101
3. Determinación de Humedad	104
4. Determinación de Cenizas	105
5. Determinación de Fibra Bruta	106
6. Determinación de lípidos (grasa bruta)	109
7. Determinación del índice de saponificación	111
8. Determinación del colágeno total	113
4.9. Determinación de Proteína bruta - Método Kjeldahl	116

10. Determinación de Ácidos Grasos	120
11. Determinación de la actividad enzimática de proteasas	128
12. Determinación de la actividad enzimática de lipasas	131
13. Hidrólisis enzimática	135
14. Desactivación de la enzima	142
15. Separación y caracterización de fases	143
16. Tratamiento estadístico de los datos	146
CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	149
1. Caracterización del sustrato	151
2. Hidrólisis con proteasas	156
1. Influencia del tipo de proteasa y el tiempo de hidrólisis	156
1. Análisis de la influencia del tipo de proteasa en el grado de hidrólisis	160
2. Análisis de la influencia del tipo de proteasa en la solubilización del residuo	163
3. Análisis de la influencia del tipo de proteasa en la recuperación de colágeno	165
4. Análisis de la influencia del tipo de proteasa en la recuperación de lípidos y distribución de ácidos grasos	167
5.2.2. Influencia de la concentración inicial de proteasa	170
3. Influencia de la concentración inicial de sustrato proteico	177
4. Influencia de la relación concentración inicial de proteasa / concentración inicial de sustrato proteico	182
5. Influencia del pH y la temperatura en la hidrólisis proteica	190
5.2.6. Cinética de la hidrólisis con proteasas	198
1. Ecuación cinética que describe el proceso de hidrólisis con Alcalase	198
2. Fenómenos justificativos de las curvas de hidrólisis con Alcalase	203
5.2.6.3. Mecanismo de la reacción de hidrólisis con Alcalase	209
5.2.6.4. Constantes y energías de activación y desactivación del proceso con Alcalase	216
3. Hidrólisis con lipasas	222
1. Influencia del tipo de lipasa y del tiempo de hidrólisis	222
5.3.2. Influencia de la concentración inicial de lipasa	233
3. Influencia de la concentración inicial de sustrato lipídico	239
4. Influencia de la relación concentración inicial de lipasa / concentración inicial de sustrato lipídico	244
5. Influencia del pH y la temperatura en la hidrólisis lipídica	253
5.3.6. Cinética de la hidrólisis con lipasas	260
1. Ecuación cinética que describe el proceso de hidrólisis con Resinase	260
2. Fenómenos justificativos de las curvas de hidrólisis con Resinase	265
5.3.6.3. Mecanismo de la reacción de hidrólisis con Resinase	271
5.3.6.4. Constantes y energías de activación y desactivación del proceso con Resinase	277

4. Hidrólisis con proteasas y lipasas simultáneamente	283
1. Análisis individual de los factores de control estudiados	287
1. Influencia de la relación concentración inicial de proteasa / concentración inicial de sustrato proteico (Eo/So)	287
2. Influencia de la relación concentración inicial de lipasa / concentración inicial de sustrato lipídico (Eo'/So')	289
5.4.1.3. Influencia del pH	292
5.4.1.4. Influencia de la temperatura	294
5.4.2. Índice Señal/Ruido	297
5.4.2.1. Proteína solubilizada	298
5.4.2.2. Lípidos separados	300
5.4.2.3. Colágeno no hidrolizado	303
5.4.2.4. Residuo no solubilizado	306
5.4.3. Superficie de respuesta	309
5.4.3.1. Proteína solubilizada	309
5.4.3.2. Lípidos separados	315
5.4.3.3. Colágeno no hidrolizado	321
5.4.3.4. Residuo no solubilizado	328
5. Evaluación económica del tratamiento	336
5.5.1. Costes de tratamiento	337
5.5.1.1. Costes de etapa de reacción	337
5.5.1.2. Costes de etapa de separación y purificación de productos	346
5.5.1.3. Costes totales	347
5.5.2. Ingresos por venta de productos	347
5.5.3. Rentabilidad del proceso	359
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	361
6. Conclusiones	363
1. Caracterización del sustrato	363
2. Hidrólisis con proteasas de la fracción proteica del residuo	363
3. Hidrólisis con lipasas de la fracción lipídica del residuo	365
4. Hidrólisis con mezcla de proteasa y lipasa	367
5. Evaluación económica del tratamiento	371
CAPÍTULO VII: NOMENCLATURA	373
7. Nomenclatura	375
CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA	383
8. Revisión Bibliográfica	385
ANEXO I: CARACTERIZACIÓN DEL RESIDUO DE CARNICERÍA	409
ANEXO II: HIDRÓLISIS CON PROTEASAS	415
A) Influencia del tipo de proteasa	419
B) Influencia de la concentración de Alcalasa	431

C) Influencia de la concentración de sustrato proteico_____	443
D) Influencia de la relación concentración de Alcalasa/concentración de sustrato_____	455
E) Influencia del pH_____	470
F) Influencia de la Temperatura_____	482
G) Adición extra de sustrato_____	494
H) Adición extra de Alcalasa_____	497
ANEXO III: HIDRÓLISIS CON LIPASAS _____	501
A) Influencia del tipo de lipasa_____	503
B) Influencia de la concentración de Resinase_____	515
C) Influencia de la concentración de sustrato lipídico_____	527
D) Influencia de la relación concentración de sustrato lipídico_____	539
E) Influencia del pH_____	554
F) Influencia de la Temperatura_____	566
G) Adición de extra de sustrato lipídico_____	578
H) Adición extra de Resinase_____	581
ANEXO IV: HIDRÓLISIS CON PROTEASA+LIPASA_____	587

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1.- Análisis del grado de cumplimiento del RD 1481/2001 sobre eliminación de residuos biodegradables en vertedero (valores en %) _____	41
Tabla 2.1.- Clasificación de las macromoléculas peptídicas _____	57
Tabla 4.1. Programación del análisis por cromatografía de gases _____	123
Tabla 4.2. Parámetros de ajuste para los ésteres metílicos (concentración en ng/μl) _____	126
Tabla 4.3.- Factores $1/\alpha$ en función de la temperatura y del pH _____	139
Tabla 4.4. Valores críticos para pruebas de discordancia de 5% y 1% para un valor extremo simple en una muestra normal _____	148
Tabla 5.1.- Composición del sustrato _____	152
Tabla 5.2.- Distribución de ácidos grasos _____	154
Tabla 5.3.- Densidad e índice de saponificación del sustrato, y peso molecular medio de lípidos y ácidos grasos _____	155
Tabla 5.4.- Características de las proteasas utilizadas _____	157
Tabla 5.5.- Condiciones de operación para los análisis de hidrólisis enzimática con distintas proteasas _____	160
Tabla 5.6.- Distribución de ácidos grasos en lípidos recuperados con distintos tipos de proteasas _____	169

Tabla 5.7.- Longitud media de cadena peptídica y masa molar media de los hidrolizados obtenidos para las diferentes relaciones de concentración de enzima/concentración de sustrato proteico (Eo/So) ensayadas	187
Tabla 5.8.- Distribución de ácidos grasos (%) en los lípidos recuperados para distintas relaciones proteasa/sustrato proteico (Eo/So)	189
Tabla 5.9.- Relación entre los parámetros determinados y el pH en la hidrólisis con Alcalase	192
Tabla 5.10.- Relación entre los parámetros determinados y la temperatura (T) en la hidrólisis con Alcalase	192
Tabla 5.11.- Longitud media de cadena peptídica y masa molar media de los hidrolizados obtenidos para los diferentes pHs y temperaturas (T) ensayados	195
Tabla 5.12.- Distribución de ácidos grasos (%) en los lípidos recuperados con Alcalase para distintos pHs	196
Tabla 5.13.- Distribución de ácidos grasos (%) en los lípidos recuperados con Alcalase para distintas temperaturas	197
Tabla 5.14.- Valores de K_1 y K_2 para las diferentes concentraciones iniciales de proteasa y de sustrato proteico (T = 50 °C, pH = 8,0)	199
Tabla 5.15.- Valores de K_1 y K_2 para diferentes valores de pH y temperatura (So = 17,45 g/l, Eo = 2.81 UA/l)	200
Tabla 5.16.- Evolución de la velocidad de reacción en la hidrólisis de proteínas con Alcalase (Eo = 2,81 UA/l, T = 50°C, pH = 8,0)	207
Tabla 5.17.- Velocidad de reacción para grados de hidrólisis determinados y distintas concentraciones de sustrato proteico (Eo = 2,81 UA/l, T = 50°C, pH = 8,0)	208
Tabla 5.18.- Proteasa inicial añadida al reactor (Eo) expresada en diferentes unidades	217
Tabla 5.19.- Características de las lipasas utilizadas	223
Tabla 5.20.- Condiciones de operación para los análisis de hidrólisis enzimática con distintas lipasas	225
Tabla 5.21.- Cantidad de ácidos grasos obtenidos (mg ácido/g lípidos) con las lipasas utilizadas (mg ácido/g lípidos)	232
Tabla 5.22.- Ajuste lineal de cada ácido graso liberado en la hidrólisis con Resinase	251
Tabla 5.23.- Relación entre los parámetros determinados y el pH en la hidrólisis con Resinase	255
Tabla 5.24.- Relación entre los parámetros determinados y la temperatura (T) en la hidrólisis con Resinase	256

Tabla 5.25.- Cantidades de ácidos grasos obtenidas (mgácido/glípidos) con Resinase para distintos pHs	257
Tabla 5.26.- Cantidades de ácidos grasos obtenidas (mgácido/glípidos) con Resinase para distintas temperaturas	258
Tabla 5.27.- Valores de K_1' y K_2' para las diferentes concentraciones iniciales de lipasa y de sustrato lipídico (T = 50°C, pH = 8,0)	261
Tabla 5.28.- Valores de K_1' y K_2' para diferentes valores de pH y temperatura ($S_0' = 63,14$ g/l, $E_0' = 52,44$ kLU/l)	262
Tabla 5.29.- Evolución de la velocidad de reacción en la hidrólisis de lípidos con Resinase ($E_0' = 52,44$ kLU/l, T = 50°C, pH = 8,0)	268
Tabla 5.30.- Velocidad de reacción para grados de hidrólisis determinados y distintas concentraciones de sustrato lipídico ($E_0 = 52,44$ kLU/l, T = 50°C, pH = 8,0)	269
Tabla 5.31.- Lipasa inicial añadida al reactor (E_0') expresada en diferentes unidades	278
Tabla 5.32.- DOE del estudio de hidrólisis con Alcalase y Resinase simultáneamente	285
Tabla 5.33.- DOE L9 ortogonal	286
Tabla 5.34.- Relación S/N para el porcentaje de proteína solubilizada	298
Tabla 5.35.- Respuesta para relaciones de señal a ruido en el porcentaje de proteína solubilizada	299
Tabla 5.36.- Relación S/N para el porcentaje de lípidos separados	301
Tabla 5.37.- Respuesta para relaciones de señal a ruido en el porcentaje de lípidos recuperados	301
Tabla 5.38.- Relación S/N para el porcentaje de colágeno no hidrolizado	303
Tabla 5.39.- Respuesta para relaciones de señal a ruido en el porcentaje de colágeno no hidrolizado	304
Tabla 5.40.- Relación S/N para el porcentaje de residuo no solubilizado	306
Tabla 5.41.- Respuesta para relaciones de señal a ruido en el porcentaje de residuo no solubilizado	307
Tabla 5.42.- Análisis de varianza para el porcentaje de proteína solubilizada	310
Tabla 5.43.- Configuración de las variables de proceso para obtención del máximo porcentaje de proteína solubilizada	315
Tabla 5.44.- Análisis de varianza para el porcentaje de lípidos recuperados	316
Tabla 5.45.- Configuración de las variables de proceso para obtención del máximo porcentaje de lípidos recuperados	321

Tabla 5.46.- Análisis de varianza para el porcentaje de lípidos recuperados__	322
Tabla 5.47.- Configuración de las variables de proceso para obtención del máximo porcentaje de colágeno no hidrolizado _____	328
Tabla 5.48.- Análisis de varianza para el porcentaje de residuo no solubilizado	329
Tabla 5.49.- Configuración de las variables de proceso para obtención del máximo porcentaje de colágeno no hidrolizado _____	335
Tabla 5.50.- Coste de las proteasas ensayadas _____	336
Tabla 5.51.- Coste de las lipasas ensayadas _____	336
Tabla 5.52.- Coste de reactivos _____	339
Tabla 5.53.- Calores implicados en el proceso y coste calorífico _____	345
Tabla 5.54.- Costes de la etapa de reacción _____	346
Tabla 5.55.- Costes de las etapas de reacción y separación y costes totales de tratamiento _____	347
Tabla 5.56.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 1 (16,38±0,04 g de lípidos recuperados) _____	349
Tabla 5.57.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 2 (16,55±0,29 g de lípidos recuperados) _____	350
Tabla 5.58.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 3 (17,30±0,02 g de lípidos recuperados) _____	351
Tabla 5.59.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 4 (17,30±0,01 g de lípidos recuperados) _____	352
Tabla 5.60.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 5 (17,98±0,03 g de lípidos recuperados) _____	353
Tabla 5.61.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 6 (18,44±0,06 g de lípidos recuperados) _____	354
Tabla 5.62.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 7 (18,06±0,07 g de lípidos recuperados) _____	355
Tabla 5.63.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 8 (18,00±0,02 g de lípidos recuperados) _____	356
Tabla 5.64.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 9 (18,44±0,04 g de lípidos recuperados) _____	357
Tabla 5.65.- Ingresos por venta de los productos obtenidos en los experimentos	358
Tabla 5.66.- Rentabilidad del proceso _____	359

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Residuos generados a nivel mundial por nivel socioeconómico en kg por persona y día	33
Figura 1.2. Generación de residuos municipales en Europa en kg per cápita en los años 2005 y 2019	35
Figura 1.3. Generación de residuos municipales en kg por habitante y año en España y Castilla y León	35
Figura 1.4. Tratamiento de residuos municipales en la Unión Europea	36
Figura 1.5. Composición de la bolsa "tipo" propuesta por el Instituto para la Sostenibilidad de los Recursos	37
Figura 1.6. Composición de la bolsa "tipo" caracterizada por nuestro grupo de investigación en la Comunidad de Castilla y León	38
Figura 1.7. Esquema actual de gestión de residuos domiciliarios en Castilla y León de acuerdo con el Plan Integral de Residuos de Castilla y León 2014	39
Figura 1.8. Composición de la fracción rechazo en la Comunidad de Castilla y León caracterizada por nuestro grupo de investigación	40
Figura 1.9. Composición de los residuos de carnicerías, pescaderías y fruterías	43
Figura 2.1. Generación por categorías de residuos de origen animal no destinados al consumo humano en España	50
Figura 2.2. Consumo de carne per-cápita en kg/año	51
Figura 2.3. Estructura de las proteínas: a) primaria, b) secundaria, c) terciaria, d) cuaternaria	53
Figura 2.4. Estructura de los lípidos	54
Figura 2.5. Hidrólisis de proteínas	56
Figura 2.6. Hidrólisis de lípidos	60
Figura 2.7. Velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato	65
Figura 2.8. Mecanismo de la cinética enzimática	65
Figura 2.9. Desplazamiento de la región experimental para la optimización del proceso	77
Figura 2.10. Superficie de respuesta (a) y gráfico de contorno (b) de un modelo de primer orden	79
Figura 2.11. Superficie de respuesta tridimensional y gráfico de contornos correspondiente	79
Figura 2.12. Factores de un proceso	82
Figura 4.1. Diagrama de flujo del proceso experimental	100

Figura 4.2. a) Molino Restch tipo SM 2000; b) Cuchillas del Molino SM 2000	102
Figura 4.3. Tamiz de base para molinos de corte SM 2000, con agujero trapezoide de 1mm de diámetro	102
Figura 4.4. Método de cuarteo	103
Figura 4.5. Horno Mufla.	105
Figura 4.6. Equipo Fibertec 1020 System M6	107
Figura 4.7. Funciones del equipo Fibertec 1020 System M6	107
Figura 4.8. Equipo de extracción Soxhlet	110
Figura 4.9. Funciones del equipo de extracción Soxhlet	110
Figura 4.10. Equipo de reacción a reflujo	112
Figura 4.11. Espectrofotómetro de doble haz. Hitachi U-2000	115
Figura 4.12. Recta de calibrado para la determinación de colágeno	115
Figura 4.13. Equipo de digestión para proteínas Block-Digest	118
Figura 4.14. Equipo de destilación por arrastre de vapor 2100 Kjeltex® System	119
Figura 4.15. Cromatógrafo de gases Agilent Technologies	122
Figura 4.16. Columna Capilar BP20	123
Figura 4.17. Microjeringa Hamilton	124
Figura 4.18. Ejemplo rectas de calibrado para determinación de ácidos grasos	125
Figura 4.19.- Recta de calibrado para determinación de la actividad enzimática de las proteasas	131
Figura 4.20.- Ejemplo de curva de progreso de la reacción para una lipasa de páncreas porcino	134
Figura 4.21. Dispositivo experimental para la hidrólisis enzimática	135
Figura 4.22.- Hidrólisis con lipasas de grasas en ácidos grasos más simples y glicerina: a) Hidrólisis inicial de triglicéridos en diglicéridos. b) Hidrólisis de diglicéridos en monoglicéridos. c) Hidrólisis final de monoglicéridos en ácidos grasos libres y glicerina	140
Figura 4.23. Montaje para desactivación de la enzima al finalizar la reacción	142
Figura 4.24. Centrifuga Digicen20	144
Figura 4.25. Fases obtenidas después del centrifugado	144
Figura 4.26. Etapa de filtración	145
Figura 5.1.- Influencia del tiempo de reacción en la hidrólisis con proteasas de los residuos cárnicos	159
Figura 5.2.- Influencia del tipo de proteasa en el grado de hidrolisis (GH)	161

Figura 5.3.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas proteasas en el porcentaje de residuo no solubilizado	164
Figura 5.4.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas proteasas en el porcentaje de proteína solubilizada	164
Figura 5.5.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas proteasas en el porcentaje colágeno no hidrolizado	166
Figura 5.6.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas proteasas en el porcentaje lípidos recuperados	168
Figura 5.7.- Desactivación de Alcalase con la temperatura y el tiempo	171
Figura 5.8.- Influencia de la concentración inicial de Alcalase en el grado de hidrólisis (GH)	172
Figura 5.9.- Relación entre el grado de hidrólisis (GH) y la concentración inicial de Alcalase	173
Figura 5.10.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Alcalase en el porcentaje de residuo no solubilizado	174
Figura 5.11.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Alcalase en el porcentaje de proteína solubilizada	174
Figura 5.12.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Alcalase en el porcentaje de colágeno no hidrolizado	175
Figura 5.13.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Alcalase en el porcentaje de lípidos recuperados	176
Figura 5.14.- Influencia de la concentración inicial de sustrato proteico en el grado de hidrólisis (GH)	178
Figura 5.15.- Relación entre el grado de hidrólisis (GH) y la concentración inicial de sustrato proteico	178
Figura 5.16.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato proteico en el porcentaje de residuo no solubilizado	179
Figura 5.17.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato proteico en el porcentaje de proteína solubilizada	180
Figura 5.18.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato proteico en el porcentaje de colágeno no hidrolizado	180

Figura 5.19.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato proteico en el porcentaje de lípidos recuperados	181
Figura 5.20.- Dependencia del grado de hidrólisis (GH) de la relación entre la concentración de Alcalase y la concentración de sustrato proteico (Eo/So)	181
Figura 5.21.- Influencia de la relación entre concentración inicial de Alcalase y la concentración inicial de sustrato proteico (Eo/So) en el grado de hidrólisis (GH)	183
Figura 5.22.- Relación entre Eo/So y el grado de hidrólisis (GH)	184
Figura 5.23.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas relaciones Eo/So en el porcentaje de residuo no solubilizado-	184
Figura 5.24.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas relaciones Eo/So en el porcentaje de proteína solubilizada	185
Figura 5.25.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas relaciones Eo/So en el porcentaje de colágeno no hidrolizado	185
Figura 5.26.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas relaciones Eo/So en el porcentaje de lípidos recuperados	186
Figura 5.27.- Influencia del pH en el grado de hidrólisis alcanzado con Alcalase (GH)	191
Figura 5.28.- Influencia de la temperatura en el grado de hidrólisis alcanzado con Alcalase (GH)	191
Figura 5.29.- Actividad de Alcalase con el pH	193
Figura 5.30.- Estabilidad de Alcalase con el pH	193
Figura 5.31.- Actividad de la Alcalase con la temperatura	194
Figura 5.32.- Evolución del grado de hidrólisis (GH) con el tiempo y la concentración de proteasa (Eo) para una concentración sustrato proteico de 17,45 g/l (T = 50°C, pH = 8,0)	201
Figura 5.33.- Evolución del grado de hidrólisis (GH) con el tiempo y la concentración de sustrato proteico (So) para una concentración de Alcalase de 2,81 UA/l (T = 50°C, pH = 8,0)	201
Figura 5.34.- Evolución del grado de hidrólisis (GH) con el tiempo y el pH (So = 17,45 g/l, Eo = 2,81 UA/l (T = 50°C, pH = 8,0)	202
Figura 5.35.- Evolución del grado de hidrólisis (GH) con el tiempo y la temperatura T (So = 17,45 g/l, Eo = 2,81 UA/l, pH = 8,0)	202
Figura 5.36.- Efecto de la adición de un 25 % extra de sustrato proteico sobre la velocidad de reacción de hidrólisis con Alcalase (So = 17,45 g/l, Eo = 2,81 UA/l, T = 50°C, pH = 8,0)	204

Figura 5.37.- Efecto de la adición de un 100 % extra de proteasa sobre la velocidad de reacción de hidrólisis de sustrato proteico ($S_o = 17,45$ g/l, $E_o = 2,81$ UA/l, $T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8,0$)	205
Figura 5.38.- Grado de hidrólisis (GH) frente a E_o ($S_o=17,45$ g/l, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8,0$)	206
Figura 5.39.- Velocidad de reacción para diferentes concentraciones iniciales de sustrato proteico y diferentes grados de hidrólisis	209
Figura 5.40.- Relación entre el parámetro K_2 y la concentración inicial de sustrato proteico S_o	216
Figura 5.41.- Relación entre el parámetro K_I y la concentración inicial de proteasa E_o ($S_o = 17,45$ g/l)	218
Figura 5.42.- Variación de la constante cinética K_I con la temperatura	220
Figura 5.43.- Variación del producto de las constantes cinéticas K_I y K_2 con la temperatura T	220
Figura 5.44.- Influencia del tiempo de reacción en el grado de hidrólisis con lipasas de los residuos cárnicos (GH')	225
Figura 5.45.- Influencia del tipo de lipasa en el grado de hidrolisis (GH')	226
Figura 5.46.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas lipasas en el porcentaje de residuo no solubilizado	228
Figura 5.47.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas lipasas en el porcentaje lípidos recuperados	229
Figura 5.48.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas lipasas en el porcentaje de proteína solubilizada	230
Figura 5.49.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas lipasas en el porcentaje colágeno no hidrolizado	231
Figura 5.50.- Influencia de la concentración inicial de Resinase en el grado de hidrólisis (GH')	234
Figura 5.51.- Relación entre el grado de hidrólisis (GH') y la concentración inicial de Resinase	234
Figura 5.52.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Resinase en el porcentaje de lípidos recuperados	236
Figura 5.53.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Resinase en la cantidad total de ácidos grasos libres obtenida	236
Figura 5.54.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Resinase en el porcentaje de residuo no solubilizado	237

Figura 5.55.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Resinase en el porcentaje de proteína solubilizada 237

Figura 5.56.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Resinase en el porcentaje de colágeno no hidrolizado
_____ 238

Figura 5.57.- Influencia de la concentración inicial de sustrato lipídico (So') en el grado de hidrólisis (GH') _____ 240

Figura 5.58.- Relación entre el grado de hidrólisis (GH') y la concentración inicial de sustrato lipídico (So') _____ 241

Figura 5.59.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato lipídico en el porcentaje de lípidos recuperados _____ 242

Figura 5.60.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato lipídico en la cantidad total de ácidos grasos libres obtenida _____ 242

Figura 5.61.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato lipídico en el porcentaje de proteína solubilizada _____ 243

Figura 5.62.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato lipídico en el porcentaje de colágeno no hidrolizado _____ 243

Figura 5.63.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato lipídico en el porcentaje de residuo no solubilizado _____ 244

Figura 5.64.- Influencia de la relación entre concentración inicial de Resinase y la concentración inicial de sustrato lipídico (Eo'/So') en el grado de hidrólisis (GH')
_____ 245

Figura 5.65.- Relación entre Eo'/So' y el grado de hidrólisis (GH') _____ 246

Figura 5.66.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas relaciones Eo'/So' en el porcentaje de lípidos recuperados _____ 247

Figura 5.67.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas relaciones Eo'/So' en el porcentaje de proteína solubilizada _____ 247

Figura 5.68.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas relaciones Eo'/So' en el porcentaje de residuo no solubilizado _____ 248

Figura 5.69.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas relaciones Eo'/So' en el porcentaje de colágeno no hidrolizado _____ 248

Figura 5.70.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas relaciones Eo'/So' en la cantidad de ácidos grasos saturados liberados _____ 250

Figura 5.71.- Influencia del grado de hidrólisis (GH´) alcanzado con distintas relaciones Eo´/So´ en la cantidad de ácidos grasos insaturados liberados	250
Figura 5.72.- Influencia del grado de hidrólisis (GH´) alcanzado con distintas relaciones Eo´/So´ en la cantidad de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados liberados	252
Figura 5.73.- Influencia del pH en el grado de hidrólisis alcanzado con Resinase (GH´)	253
Figura 5.74.- Relación entre el grado de hidrólisis (GH´) y el pH	254
Figura 5.75.- Influencia de la temperatura en el grado de hidrólisis alcanzado con Resinase (GH´)	254
Figura 5.76.- Influencia del grado de hidrólisis (GH´) alcanzado con distintos pHs en la cantidad total de ácidos grasos libres obtenida	259
Figura 5.77.- Influencia del grado de hidrólisis (GH´) alcanzado con distintas temperaturas en la cantidad total de ácidos grasos libres obtenida	259
Figura 5.78.- Evolución del grado de hidrólisis (GH´) con el tiempo y la concentración de lipasa (Eo´) para una concentración sustrato lipídico de 63,14 g/l (T = 50°C, pH = 8,0)	263
Figura 5.79.- Evolución del grado de hidrólisis (GH´) con el tiempo y la concentración de sustrato lipídico (So´) para una concentración de Resinase de 52,44 kLU/l (T = 50°C, pH = 8,0)	263
Figura 5.80.- Evolución del grado de hidrólisis (GH´) con el tiempo y el pH (So´ = 63,14 g/l, Eo´ = 52,44 kLU/l, T = 50°C)	264
Figura 5.81.- Evolución del grado de hidrólisis (GH´) con el tiempo y la temperatura T (So´ = 63,14 g/l, Eo´ = 52,44 kLU/l, pH = 8,0)	264
Figura 5.82.- Efecto de la adición de un 25 % extra de sustrato lipídico sobre la velocidad de reacción de hidrólisis con Resinase (So´ = 63,14 g/l, Eo´ = 52,44 kLU/l, T = 50°C, pH = 8,0)	265
Figura 5.83.- Efecto de la adición de un 100 % extra de lipasa sobre la velocidad de reacción de hidrólisis de sustrato lipídico (So´ = 63,14 g/l, Eo´ = 52,44 kLU/l, T = 50°C, pH = 8,0)	266
Figura 5.84.- Grado de hidrólisis (GH´) frente a Eo´ t (So´ = 63,14 g/l, T=50°C, pH=8,0)	267
Figura 5.85.- Velocidad de reacción para diferentes concentraciones iniciales de sustrato lipídico y diferentes grados de hidrólisis	270
Figura 5.86.- Relación entre el parámetro K₂´ y la concentración inicial de sustrato lipídico So´	277

Figura 5.87.- Relación entre el parámetro K_1' y la concentración inicial de lipasa E_0' ($S_0' = 63,14$ g/l)	279
Figura 5.88.- Variación de la constante cinética K_1' con la temperatura T	281
Figura 5.89.- Variación del producto de las constantes cinéticas K_1' y K_2' con la temperatura T	281
Figura 5.90.- Influencia de la relación E_0/S_0 en el porcentaje de lípidos recuperados	287
Figura 5.91.- Influencia de la relación E_0/S_0 en el porcentaje de proteína solubilizada	288
Figura 5.92.- Influencia de la relación E_0/S_0 en el porcentaje de colágeno no hidrolizado	288
Figura 5.93.- Influencia de la relación E_0/S_0 en el porcentaje de residuo no solubilizado	289
Figura 5.94.- Influencia de la relación E_0'/S_0' en el porcentaje de lípidos recuperados	290
Figura 5.95.- Influencia de la relación E_0'/S_0' en el porcentaje de proteína solubilizada	290
Figura 5.96.- Influencia de la relación E_0'/S_0' en el porcentaje de colágeno no hidrolizado	291
Figura 5.97.- Influencia de la relación E_0'/S_0' en el porcentaje de residuo no solubilizado	291
Figura 5.98.- Influencia del pH en el porcentaje de lípidos recuperados	292
Figura 5.99.- Influencia del pH en el porcentaje de proteína solubilizada	293
Figura 5.100.- Influencia del pH en el porcentaje de colágeno no hidrolizado	293
Figura 5.101.- Influencia del pH en el porcentaje de residuo no solubilizado	294
Figura 5.102.- Influencia de la temperatura en el porcentaje de lípidos recuperados	295
Figura 5.103.- Influencia de la temperatura en el porcentaje de proteína solubilizada	295
Figura 5.104.- Influencia de la temperatura en el porcentaje de colágeno no hidrolizado	296
Figura 5.105.- Influencia de la temperatura en el porcentaje de residuo no solubilizado	296
Figura 5.106. Efectos de los parámetros del proceso en el porcentaje de proteína solubilizada	299

Figura 5.107. Efectos de los parámetros del proceso en el porcentaje de lípidos recuperados	302
Figura 5.108. Efectos de los parámetros del proceso en el porcentaje de colágeno no hidrolizado	304
Figura 5.109. Efectos de los parámetros del proceso en el porcentaje de residuo no solubilizado	307
Figura 5.110. Diagrama de Pareto para el porcentaje de proteína solubilizada	311
Figura 5.111. Representación del porcentaje de proteína solubilizada calculado frente al obtenido experimentalmente	311
Figura 5.112. Gráficas de superficie de respuesta y de contorno para el porcentaje de proteína solubilizada mostrando los efectos de la interacción de Eo/So-Eo'/So', Eo/So-pH y Eo/So-T	313
Figura 5.113. Gráficas de superficie de respuesta y de contorno para el porcentaje de proteína solubilizada mostrando los efectos de la interacción de Eo/So'-pH y Eo'/So'-T y pH-T	314
Figura 5.114. Gráficas de optimización de respuesta para el porcentaje de proteína solubilizada	315
Figura 5.115. Diagrama de Pareto para el porcentaje de lípidos recuperados	317
Figura 5.116. Representación del porcentaje de lípidos recuperados calculado frente al obtenido experimentalmente	317
Figura 5.117. Gráficas de superficie de respuesta y de contorno para el porcentaje de lípidos recuperados mostrando los efectos de la interacción de Eo/So-Eo'/So', Eo/So-pH y Eo/So-T	319
Figura 5.118. Gráficas de superficie de respuesta y de contorno para el porcentaje de lípidos recuperados mostrando los efectos de la interacción de Eo/So'-pH y Eo'/So'-T y pH-T	320
Figura 5.119. Gráficas de optimización de respuesta para el porcentaje de lípidos recuperados	321
Figura 5.120. Diagrama de Pareto para el porcentaje de colágeno no hidrolizado	323
Figura 5.121. Representación del porcentaje de colágeno no hidrolizado calculado frente al obtenido experimentalmente	324
Figura 5.122. Gráficas de superficie de respuesta y de contorno para el porcentaje de colágeno no hidrolizado mostrando los efectos de la interacción de Eo/So-Eo'/So', Eo/So-pH y Eo/So-T	326

Figura 5.123. Gráficas de superficie de respuesta y de contorno para el porcentaje de colágeno no hidrolizado mostrando los efectos de la interacción de Eo/So'-pH y Eo'/So'-T y pH-T	327
Figura 5.124. Gráficas de optimización de respuesta para porcentaje de colágeno no hidrolizado	328
Figura 5.125. Diagrama de Pareto para el porcentaje de residuo no solubilizado	330
Figura 5.126. Representación del porcentaje de residuo no solubilizado calculado frente al obtenido experimentalmente	331
Figura 5.127. Gráficas de superficie de respuesta y de contorno para el porcentaje de residuo no solubilizado mostrando los efectos de la interacción de Eo/So-Eo'/So', Eo/So-pH y Eo/So-T	333
Figura 5.128. Gráficas de superficie de respuesta y de contorno para el porcentaje de residuo no solubilizado mostrando los efectos de la interacción de Eo/So'-pH y Eo'/So'-T y pH-T	334
Figura 5.129. Gráficas de optimización de respuesta para porcentaje de residuo no solubilizado	335
Figura 5.130. Relación entre el grado de hidrólisis de proteínas y el porcentaje de proteína solubilizada.	343
Figura 5.131. Relación entre el grado de hidrólisis de lípidos y el porcentaje de lípidos recuperados.	343

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Se denominan residuos domésticos aquellos residuos sólidos generados en los hogares como consecuencia de las actividades domésticas y también los similares a los anteriores generados en servicios e industrias, y residuos comerciales aquellos residuos generados por la actividad propia del comercio, al por mayor y al por menor, de los servicios de restauración y bares, de las oficinas y de los mercados, así como del resto del sector servicios (Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados). El conjunto de ambos tipos de residuos constituye los residuos municipales y, dadas sus características, su generación depende directamente del nivel socioeconómico de la población.

Según el informe realizado en Septiembre del 2018 por el Banco Mundial, y titulado “What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050” (Kaza *et al.*, 2018), se produce una mayor cantidad de residuos municipales cuanto mayor sea el nivel de vida que hay en la zona tal y como puede verse en la figura 1.1, en la que áreas tales como Estados Unidos y Australia generan una cantidad más elevada de residuos (más de 1,50 kg per cápita y día) y, en cambio, ciertas zonas de África o de Asia tienen una mucho menor generación de residuos (menos de 0,49 kg per cápita y día).

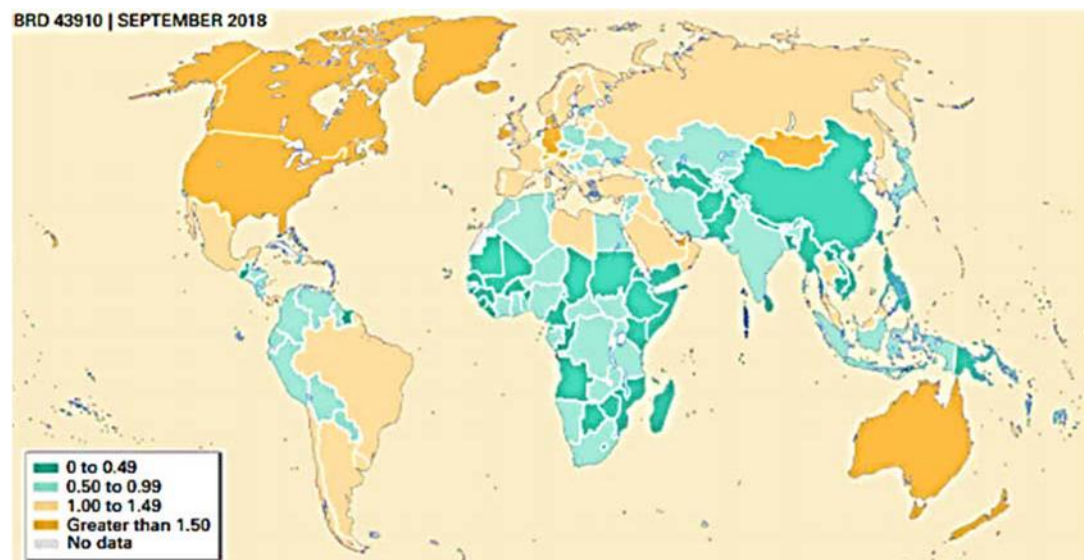


Figura 1.1. Residuos generados a nivel mundial por nivel socioeconómico en kg por persona y día (Kaza et al., 2018)

A nivel mundial, Hoornweg et al. (2013) indicaron que en el año 2010 la generación de residuos municipales fue de poco más de 3,5 millones de toneladas por día, pero, si siguen las actuales tendencias socioeconómicas mundiales, se espera que en el año 2025 se superen más de 6 millones de toneladas por día lo que supone una generación de residuos un 70 % superior a la de 2010.

A nivel europeo se aprecia también la relación entre la generación de residuos municipales y el desarrollo de los países. En la figura 1.2 están representados los datos publicados por la Oficina Estadística de la Unión Europea, respecto a la generación de esos residuos para los años 2005 y 2019 en los 27 países que conforman la Unión Europea y en el Reino Unido (Eurostat, 2020).

En esa figura se puede observar cómo, en 2019, la generación de residuos en Europa oscila entre 283 kg/habitante.año para el caso del país con menor renta per cápita (Rumania) y 844 kg/habitante.año para el caso del país con mayor renta per cápita (Dinamarca).

También se puede observar en esa figura la evolución en la generación de residuos con el desarrollo de los países con los años: al comparar los datos de 2005 con los de 2019 se ve que aquellos países en los que aumentó su nivel de vida (como, por ejemplo, Noruega o Dinamarca), incrementaron la producción de residuos.

Sin embargo, en relación con esta afirmación hay que indicar que hay excepciones ya que hay países, como España, en los que determinadas políticas de gestión de residuos y legislaciones más restrictivas han llevado a una reducción en la generación de residuos municipales en los últimos años; en concreto en España se ha pasado de generar 588 kg/habitante.año en 2005 a 476 kg/habitante.año en 2019, valor ligeramente inferior al de la media europea en ese año (502 kg/habitante.año).

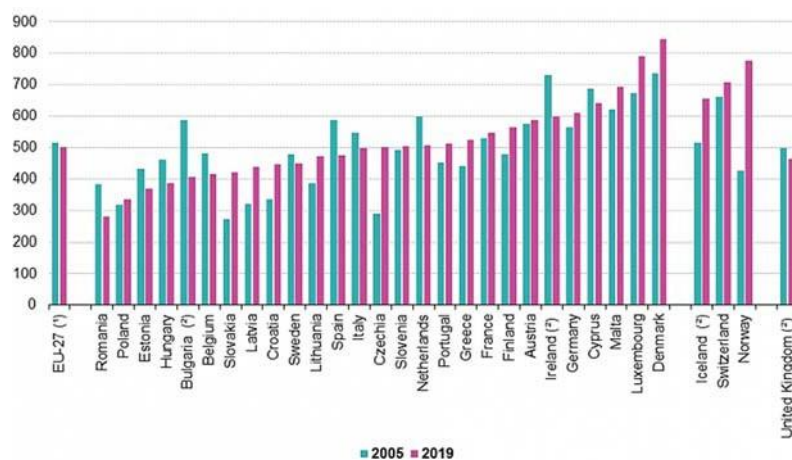


Figura 1.2. Generación de residuos municipales en Europa en kg per cápita en los años 2005 y 2019 (Eurostat, 2020)

Dentro de la media española, la comunidad autónoma de Castilla y León presenta una generación de RU ligeramente inferior a la nacional con un valor, en 2019, de 416 kg por habitante (figura 1.3).

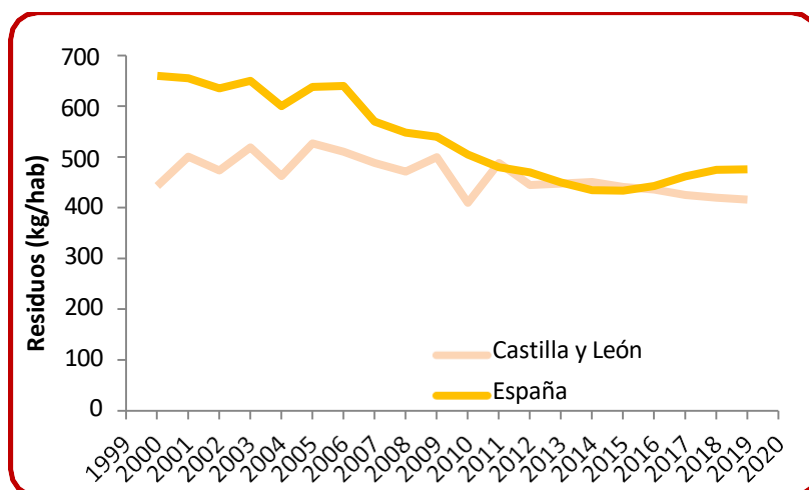


Figura 1.3. Generación de residuos municipales en kg por habitante y año en España y Castilla y León (Junta de Castilla y León, 2000-2019; Ministerio de Medio Ambiente, 2003-2007; Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2008-2011; Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2012-2017; Ministerio para la Transición Ecológica, 2018-2019; Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, 2020)

Si bien la disminución en la generación de residuos municipales en la Comunidad de Castilla y León y, en general, en España es algo excelente, el problema surge cuando se analiza el destino de estos residuos. Mientras en la Unión Europea un 76 % de los residuos es recuperado en forma de reciclado, compost o por valorización energética y sólo un 24 % es llevado a vertedero, en España, ocurre lo contrario: el 54 % son depositados en vertedero y sólo una proporción del 46 % son recuperados de una forma u otra (figura 1.4). En los estudios hechos por nuestro grupo de investigación de Gestión Ambiental y Aprovechamiento de Recursos de la Universidad de Salamanca, en cuyas investigaciones se enmarca este trabajo, el porcentaje llevado a vertedero aumenta hasta un 70 % en la Comunidad de Castilla y León.

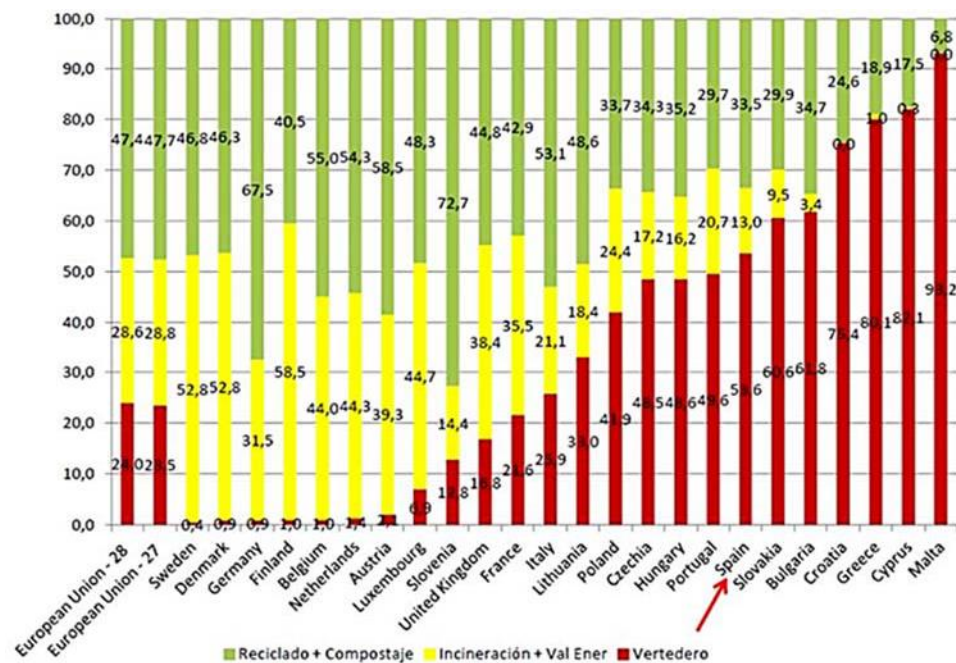


Figura 1.4. Tratamiento de residuos municipales en la Unión Europea (Fundación para la Economía Circular, 2020)

Esto indica la necesidad de mejorar el tratamiento de residuos en España para reducir la cantidad de los mismos llevada a vertedero con el fin de proteger, preservar y optimizar la calidad del medio ambiente, así como proteger la salud humana, garantizando la utilización prudente, eficiente y racional de los recursos naturales.

Partiendo de esta problemática, se ha examinado la causa de la elevada cantidad de residuos sólidos llevada a vertedero en España, buscando una solución al problema.

El análisis del tratamiento a que se somete a los residuos municipales en este país, indica que hay separación en origen de determinados residuos como plástico, papel, envases y vidrio, lo que permite deducir que el problema proviene de la parte de residuos no separados en origen, lo que se denomina bolsa “todo uno” que es aquella en la que, en domicilios y comercios, se echa todo lo que no se recicla.

Según el Instituto para la Sostenibilidad de los Recursos (Plan Integral de Residuos de Castilla y León 2014 actualmente en vigor), la composición de la bolsa tipo debería ser la que aparece en la figura 1.5, en la que el contenido en materia orgánica es del orden de una tercera parte nada más.

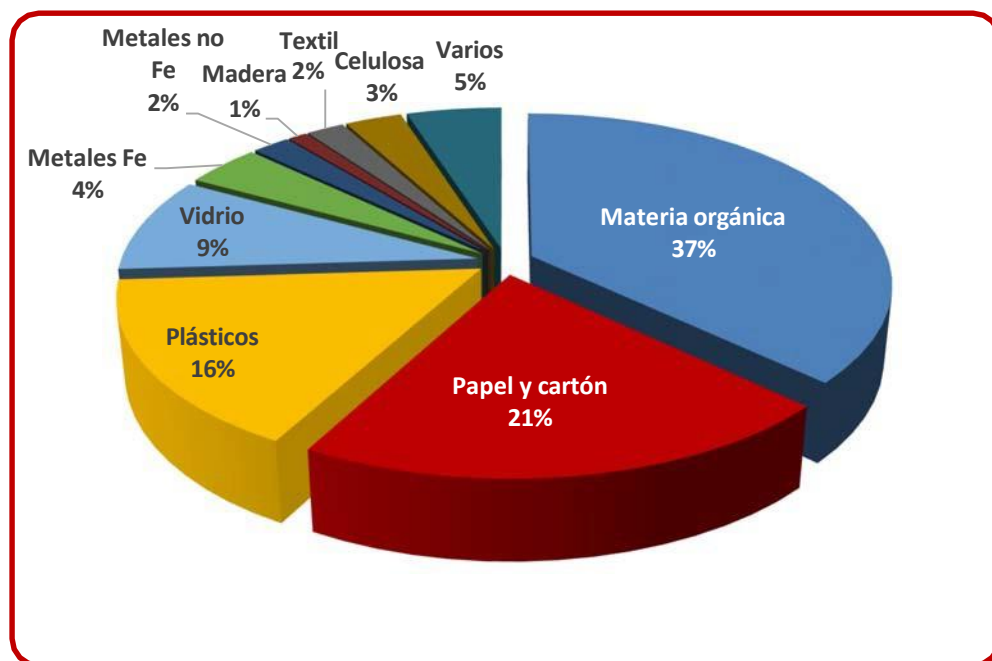


Figura 1.5. Composición de la bolsa "tipo" propuesta por el Instituto para la Sostenibilidad de los Recursos

Sin embargo, las caracterizaciones llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación en las bolsas “todo uno” en la Comunidad de Castilla y León reflejaron un contenido en materia orgánica mucho más elevado (superior al 50 %) y un contenido en vidrio, papel, plástico y metal inferior indicativo de un muy buen funcionamiento de la separación en origen (figura 1.6).

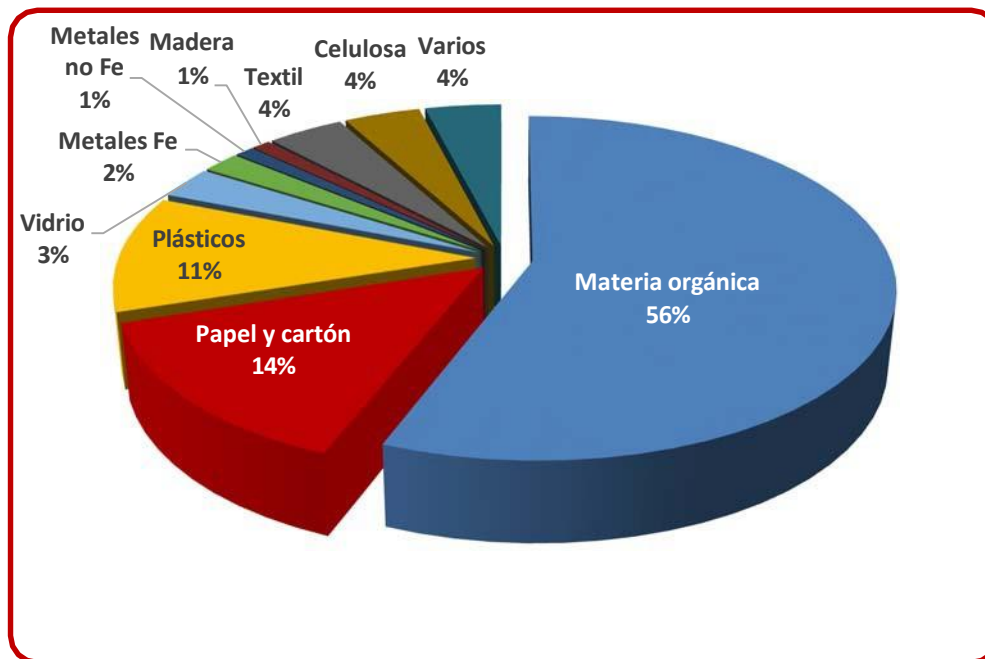


Figura 1.6. Composición de la bolsa "tipo" caracterizada por nuestro grupo de investigación en la Comunidad de Castilla y León

Teniendo en cuenta que, de acuerdo con el modelo actual de gestión de residuos domiciliarios dado en el Plan Integral de Residuos de Castilla y León 2014 actualmente en vigor (figura 1.7), el residuo que llega en la bolsa “todo uno” a los Centros de Tratamiento de Residuos (CTRs) se separa en varias fracciones y que solamente una de ellas, la fracción rechazo, es la que se lleva a vertedero, obviamente, el problema radica en esta fracción

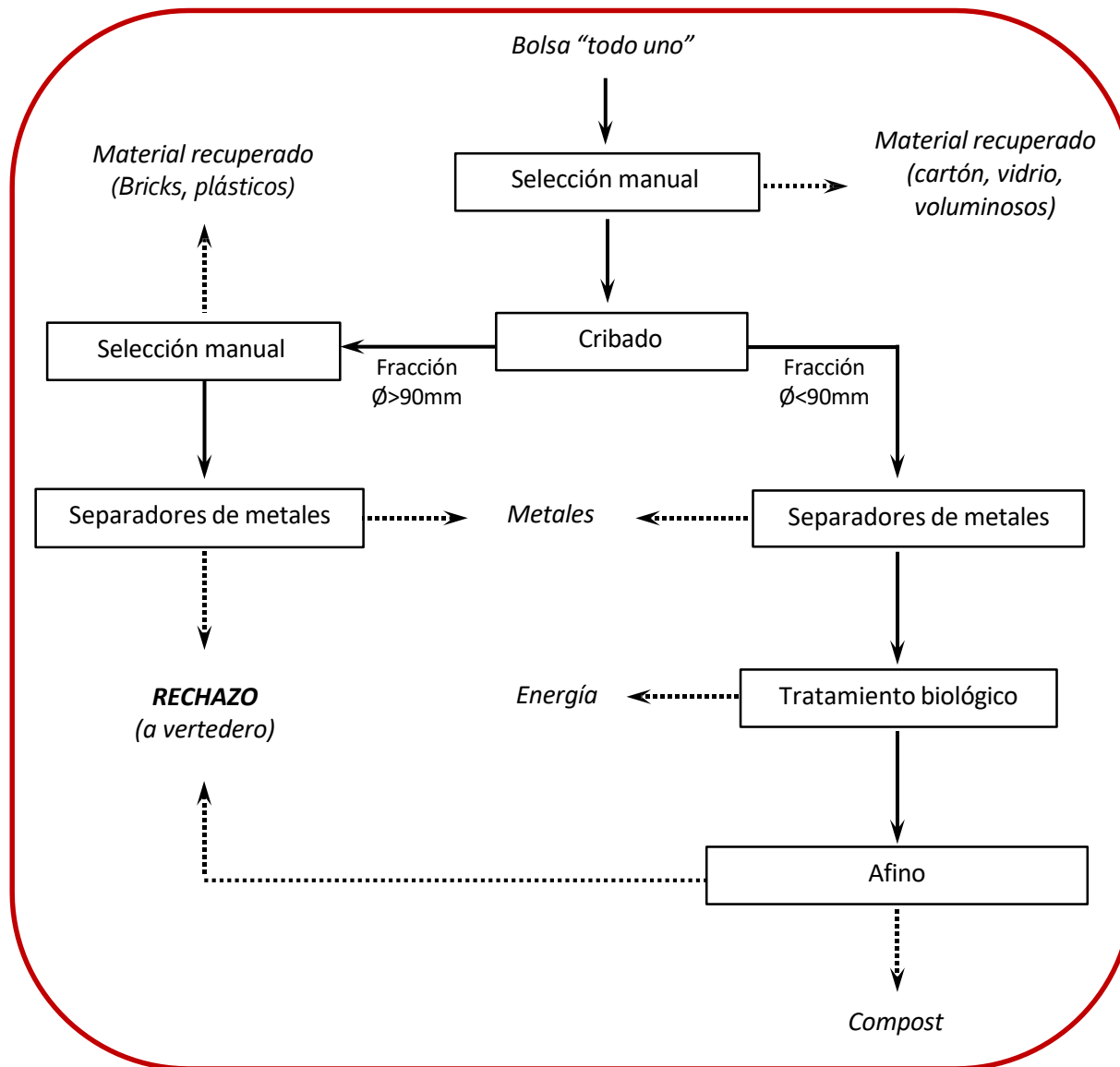


Figura 1.7. Esquema actual de gestión de residuos domiciliarios en Castilla y León de acuerdo con el Plan Integral de Residuos de Castilla y León 2014

Esto hace imprescindible conocer la composición media del rechazo que sale de los CTRs y que se deposita en vertedero para poder encontrar una solución al problema. La caracterización de la fracción rechazo de los CTRs de Castilla y León realizada en estudios previos por nuestro grupo de investigación indica que más del 50 % del mismo es material biodegradable: materia orgánica y papel-cartón (figura 1.8).

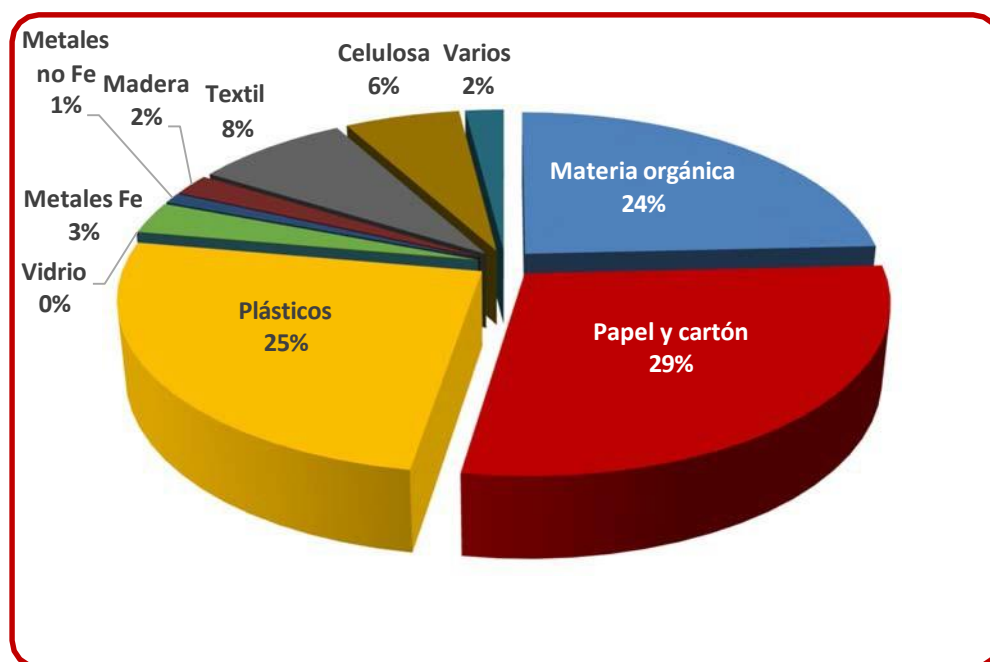


Figura 1.8. Composición de la fracción rechazo en la Comunidad de Castilla y León caracterizada por nuestro grupo de investigación

En relación con la cantidad de material biodegradable destinada a vertedero hay que reseñar que el Plan Estatal Marco de Gestión de Residuos (PEMAR) 2016-2022, basado en la legislación europea a través de su Directiva 1999/31/CE relativa al vertido de residuos y en la legislación española (traspuesta de la Directiva europea) a través del Real Decreto 1481/2001 por el que se regula la eliminación de residuos mediante depósito en vertedero parcialmente modificado por la Orden Ministerial AAA/661/2013, limita esa cantidad de modo que, desde el año 2016, no puede superar el 35 % de los residuos biodegradables generados en 1995.

Con el fin de comprobar el grado de cumplimiento esta normativa en la Comunidad de Castilla y León se ha llevado a cabo un estudio para determinar el porcentaje de residuos biodegradables en vertedero respecto a 1995. En el análisis realizado se ha asumido que la composición de los residuos municipales en España en 1995 era similar a los primeros datos de los que se dispone y que corresponden a 1999 (Ministerio de medio Ambiente, 2003). De acuerdo con esto, se tiene que el 67,4% de los residuos municipales que se generaban en 1995 eran residuos biodegradables que eran depositados en un vertedero sin ningún tipo de tratamiento. Teniendo en cuenta la información dada por la Junta de Castilla y León en relación con la cantidad de residuos municipales generados y

las cantidades de esos residuos recuperadas, transformadas en compost o energía o llevadas a vertedero como rechazo indicadas en el Plan Integral de Residuos de Castilla y León 2014 y en informes de la Junta de Castilla y León (2000-2019), del Ministerio de Medioambiente (2003-2007), del Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (2008-2011), del Ministerio de Agricultura, Alimentación y medioambiente (2012-2017) del Ministerio para Transición Ecológica (2018-2019) y del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (2020), se han determinado los datos que aparecen en la tabla 1.1.

Tabla 1.1.- Análisis del grado de cumplimiento del RD 1481/2001 sobre eliminación de residuos biodegradables en vertedero (valores en %)

	1995	2006	2009	2016	2018	2020*
Generación de residuos respecto a 1995	--	+ 16,20	+8,55	-8,32	-4,91	-3,65
Relación Rechazo/Entrada a CTR	100,00	76,5	78,63	75,08	69,96	67,18
Objetivo residuos biodegradables en vertedero respecto a 1995 (RD 1481/2001)	--	75	50	35	35	35
Residuos biodegradables en vertedero respecto a 1995	--	74,80	74,70	65,09	65,81	62,36

* Valores estimados

Los datos indican que, en Castilla y León, se alcanzó el objetivo fijado para el año 2006 (74,8 % de residuos biodegradables en vertedero respecto a 1995 frente al 75 % fijado como objetivo) gracias, fundamentalmente, a la instalación de los 10 CTRs. Sin embargo, no se alcanzó el objetivo de 2009 (74,7 % de residuos biodegradables en vertedero respecto a 1995 frente al 75 % fijado como objetivo), ni el de 2016 (65,09 % de residuos biodegradables en vertedero respecto a 1995 frente al 35 % fijado como objetivo) o años posteriores como 2018 (65,81 % de residuos biodegradables en vertedero respecto a 1995 frente al 35 % fijado como objetivo). Las previsiones del año 2020, del que aún no hay datos disponibles (la publicación de datos estadísticos referentes a residuos sólidos va siempre, como mínimo, con dos años de retraso), parecen indicar que habría una disminución en la cantidad de residuos biodegradables depositados en vertedero pero no suficiente (62,36 % de residuos biodegradables en vertedero respecto a 1995 frente al 35 % fijado como objetivo).

La razón fundamental para no haber alcanzado el 35% de reducción es que la generación de residuos municipales no se ha reducido en los porcentajes esperados. Para cumplir con el objetivo del 35 %, el rechazo depositado en vertedero no debería haber sido mayor del 38,6% de los residuos de entrada al CTR y eso no se está observando ya que la relación entre la fracción residuo y los residuos de entrada sigue superando el 60%.

Esta situación hace necesario buscar una alternativa para conseguir la reducción de materia biodegradable depositada en vertedero. Una opción sería sustituir los CTRs actuales por otros con mayor rendimiento de recuperación, lo cual es inviable por el elevado coste económico que implica. Dado que la materia biodegradable está constituida por materia orgánica y papel y cartón, una mayor separación en origen de esta última fracción también mejoraría la situación. Otra alternativa, que es la propuesta en esta tesis doctoral, es la separación en origen de la materia orgánica y su aprovechamiento mediante su transformación en otros productos de mayor valor añadido, cosa que actualmente no se está haciendo.

Analizada la procedencia de esa materia orgánica (comercios, hogares y restaurantes), se aprecia que la parte más fácil de separar en origen es la correspondiente a los residuos orgánicos de carnicería, pescadería y frutería que son generados en cantidades muy elevadas y que pueden separarse en los propios comercios en los que se originan. Las cantidades de estos residuos generadas en la Comunidad de Castilla y León oscilan entre 1 y 3 toneladas diarias (García et al., 2005):

- Pescaderías: 8,3 kg/establecimiento/día, 759 kg/día.
- Carnicerías: 12,8kg/establecimiento/día, 3650 kg/día.
- Fruterías: 10,8 kg/establecimiento/día, 918 kg/día).

Con el objetivo de comprobar la posibilidad de transformar esos residuos en productos con elevado valor añadido es preciso examinar la composición de estos, comprobándose que los residuos de fruterías tienen como componente mayoritario los hidratos de carbono mientras que los residuos de carnicería y pescadería tienen como componentes mayoritarios proteínas y lípidos (figura 1.9).

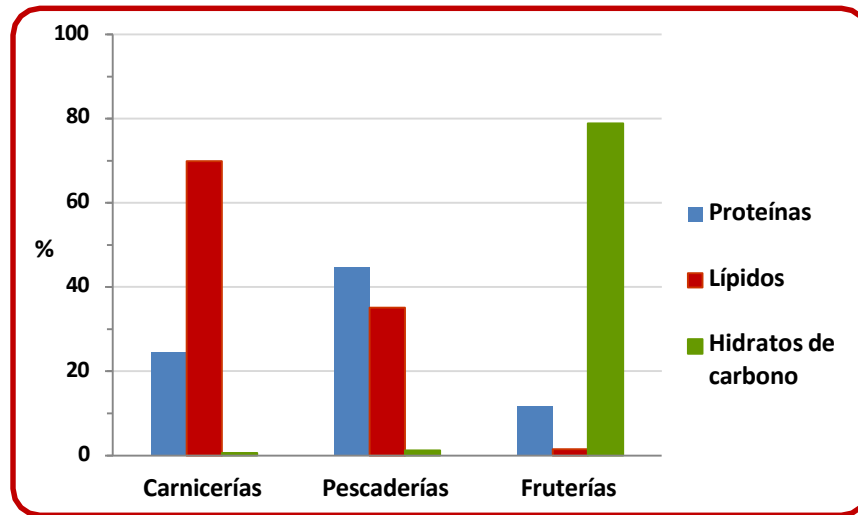


Figura 1.9. Composición de los residuos de carnicerías, pescaderías y fruterías (García et al., 2005; Araujo et al., 2021)

Dado que las proteínas y los lípidos, así como sus derivados, alcanzan un mayor precio en el mercado que los hidratos de carbono, y que la cantidad de residuos orgánicos generada en carnicerías es muy superior a las cantidades de residuos orgánicos generados en pescaderías, este trabajo se centró en la separación en origen de los residuos generados en carnicerías para su transformación en productos con mayor valor añadido como: colágeno, hidrolizados proteicos, lípidos y ácidos grasos de gran aplicación actual en la industria cosmética, dietética, de fabricación de jabones, de biodiesel... (Johnson, 2001; Manninen, 2009; Bart et al., 2010; Ścibisz et al., 2008; Pasupuleti et al., 2014; Sionkowska et al., 2017).

La utilización de los residuos de carnicería para esos fines no presenta ningún inconveniente ya que este tipo de residuos pertenece a la categoría 3 de acuerdo con el Reglamento (CE) N.º 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por el cual establece las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano (SANDACH). Los residuos de esta categoría son los de menor riesgo y pueden procesarse para la fabricación de alimentos para animales, para la fabricación de cosméticos, para la fabricación de productos farmacéuticos, etc., por lo que no hay impedimento en su utilización como materia prima para obtención de productos de mayor valor añadido.

Para el aprovechamiento de estos residuos es necesaria la separación de la parte proteica de la parte lipídica y ello puede realizarse mediante hidrólisis ya que ésta tiene la capacidad de separar no sólo la fracción peptídica sino también los lípidos de la fracción sólida.

La hidrólisis puede llevarse a cabo con catalizadores ácidos, básicos o enzimáticos. Las condiciones de operación en la hidrólisis ácida son más exhaustivas en cuanto a pH y temperaturas (Fountoulakis y Lahm, 1998). Algunos aminoácidos como el triptófano son totalmente destruidos por la hidrólisis ácida y otros como serina, treonina, valina, leucina e isoleucina son parcialmente destruidos. Tampoco la hidrólisis básica es la más adecuada porque otros aminoácidos son sensibles a pH altos (Nollet y Toldra, 2008). Sin embargo, la hidrólisis enzimática tiene una serie de características que recomiendan su utilización en el tratamiento de los residuos cárnicos. Se considera un método rápido y reproducible, permite trabajar en condiciones de operación suaves de pH y temperatura y en ausencia de reactivos químicos agresivos, y es más fácil de controlar. Todo ello hace que se reduzca el riesgo de producirse reacciones indeseadas que destruyan componentes valiosos de las proteínas (Clemente, 2000).

Estudios realizados sobre hidrólisis enzimática de productos cárnicos (Nchiencia et al., 2010; Minh et al., 2014; Mora et al., 2014; Brandelli et al., 2015; Song et al., 2016) avalan la posibilidad de su utilización en el tratamiento de los residuos de carnicería.

Por este motivo el objeto de esta tesis doctoral se basa en el estudio de la hidrólisis de los residuos de productos cárnicos destinados al consumo humano (residuos de carnicería) con enzimas como catalizador con el fin de transformar un residuo problemático en un producto de elevado valor añadido cuyo uso permitirá reducir la cantidad de residuos biodegradables destinados a vertedero. Con la utilización de enzimas como catalizador se pretende conseguir una transformación en condiciones de operación más sencillas y, como consecuencia, un abaratamiento del proceso que haga mayor la rentabilidad del mismo.

**CAPÍTULO II: FUNDAMENTO
TEÓRICO Y REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA**

1. Residuos de Origen Animal No Destinados al Consumo Humano

Los residuos de origen animal no destinados al consumo humano son sustancias orgánicas procedentes de la cría, sacrificio y comercialización de animales. Son muy numerosas las sustancias incluidas en este término, entre ellas orina, excrementos, y residuos procedentes de las industrias cárnica, láctea, piscícola y cinegética (como como plumas, huesos, pieles, sangre, cueros, grasas, pelos, picos y pezuñas) y de su comercialización (restos de carne, huesos, grasa... no vendidos en los comercios).

1. SANDACH

Ante los tipos de sustancias tan diferentes que comprende este tipo de residuos, sus orígenes tan diversos, su composición tan distinta y sus posibles destinos tan numerosos, la Comisión Europea decidió en el año 2011, a través del Reglamento (CE) N.º 1069/2009, elaborar una legislación específica para estas sustancias. Dicho reglamento engloba tales productos bajo el nombre de SANDACH (Subproductos de origen Animal No Destinados Al Consumo Humano) y los agrupa en tres categorías en función de su procedencia y composición a la par que establece su posible destino final. Con este reglamento se pretende tener un mayor control sobre este tipo de residuos además de suprimir los usos incorrectos a los que tradicionalmente estaban destinados, donde lo más común era emplearlos para alimentar al ganado o incrementar la fertilidad de los cultivos.

Esta normativa dio lugar a la creación de una red de establecimientos SANDACH donde todo tipo de industria susceptible de usar o generar esta clase de residuos deberá estar registrada y correctamente identificada. Además, este reglamento aument las opciones de gestión de ese tipo de residuos permitiendo tratamientos hasta entonces no utilizados.

En España, el Real Decreto 1528/2012 estableció las condiciones de aplicación de la normativa comunitaria sobre SANDACH. Entre otras medidas, crea la Comisión Nacional de Subproductos de origen Animal No Destinados Al Consumo Humano entre cuyas funciones figuran el seguimiento y la coordinación de la ejecución de la normativa sobre SANDACH, con el objetivo de garantizar la salud pública, la sanidad animal y la

conservación del medio ambiente sin causar perjuicio a la actividad económica que este sector genera en el país.

Según el Plan Nacional Integral de los SANDACH aprobado en la ORDEN PRE/468/2008, de 15 de febrero, el ámbito de aplicación del Real Decreto se llevará a cabo principalmente sobre:

- Explotaciones ganaderas (incluida la acuicultura).
- Mataderos, industrias alimentarias y empresas de distribución alimentaria (mayoristas y minoristas).
- Establecimientos de transformación y gestión de subproductos.

Este Plan, que fomenta la valorización frente a la eliminación favoreciendo a las industrias destinadas a obtener un rendimiento de estos residuos, está basado en las tres categorías fijadas en el Reglamento (CE) N.º 1069/2009:

- Categoría 1: incluye aquellos residuos con mayor probabilidad de contaminación, entre otras cosas, por presencia de sustancias cuyo contenido sobrepase los niveles permitidos o que puedan suponer un peligro medioambiental. Esta categoría hace especial incidencia en aquellos residuos que puedan encontrarse infectados por una Encefalopatía Espongiforme Transmisible (EET).
- Categoría 2: engloba aquellos residuos que sin contener sustancias que superen los límites legales o puedan ser perjudiciales para el medio ambiente, sean susceptibles de generar un cierto riesgo en un momento determinado. En esta categoría también se incluye, por ejemplo, el estiércol y el contenido del tubo digestivo.
- Categoría 3: comprende los residuos que menor riesgo pueden ocasionar, como restos de animales que siendo aptos para el consumo humano no se destinan a tales fines simplemente por motivos comerciales. También se incluyen aquellas

partes de animales que no presentando riesgo de transmisión a humanos y animales hayan sido desestimadas para el consumo humano.

La valorización fomentada por el Plan también está basada en el Reglamento (CE) N.º 1069/2009 en el que se indica cómo debe realizarse la eliminación y el uso en función de cada categoría.

Entre las posibles vías de eliminación y uso de los residuos de categoría 1 están incineración o co-incineración incluyendo o sin incluir procesamiento previo (esterilización a presión), el enterramiento con procesamiento previo por esterilización a presión, la utilización como combustible con o sin procesamiento previo, el enterramiento en vertedero autorizado o los usos técnicos (medicamentos veterinarios, productos sanitarios, productos cosméticos...).

En el caso de los residuos de categoría 2, además de las vías mencionadas para los residuos de categoría 1, existe la posibilidad de fabricar abonos y enmiendas de origen orgánico para el suelo previo procesamiento por esterilización a presión cuando sea necesario, o de producir compost o biogás.

En los residuos considerados de categoría 3, además de las aplicaciones contempladas para los residuos de las categorías 1 y 2, se contemplan otras opciones, como el procesamiento para fabricación de piensos para animales o fabricación de alimentos crudos.

En la Comunidad de Castilla y León se genera la mayor cantidad de residuos de categoría 3 de toda España (figura 2.1). Este puede ser un motivo adicional de que llegue a vertedero una cantidad excesivamente alta de materia biodegradable.

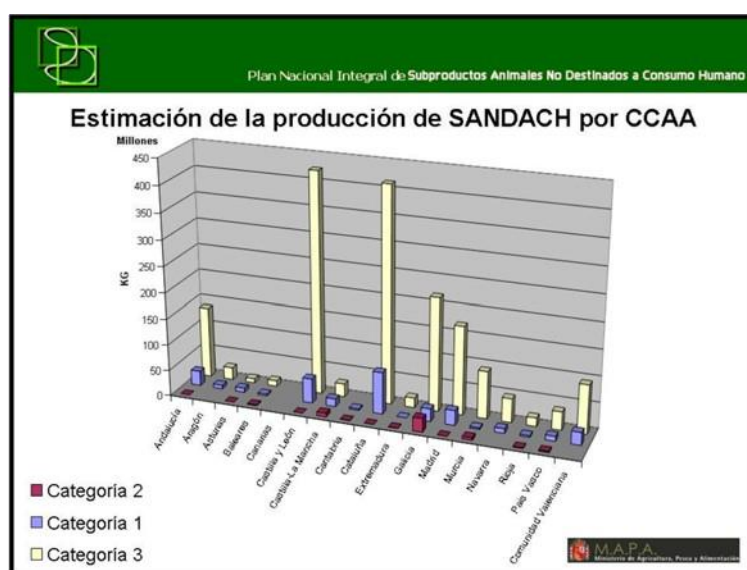


Figura 2.1. Generación por categorías de residuos de origen animal no destinados al consumo humano en España (Plan Nacional Integral de los SANDACH)

2.1.2. Residuos de carnicerías

Los residuos de carnicerías están constituidos por parte del género en venta en las mismas que originalmente tenía como destino el consumo humano pero que no ha llegado a tal destino bien porque no se ha vendido, bien porque son restos procedentes de la limpieza y acondicionamiento de las piezas vendidas.

Por ello estos residuos están incluidos dentro de la categoría 3 de los SANDACH. Dado que, como se ha indicado, los residuos de esa categoría pueden ser transformados en alimentos, cosméticos, combustibles, etc., no existe impedimento para la utilización de los residuos de carnicerías como materia prima en la obtención de subproductos con elevado valor añadido, que es el objeto de esta tesis doctoral.

Los residuos de carnicería son consecuencia del consumo de carne por parte del ser humano ya que, desde tiempos remotos, ha formado parte de su dieta (Kenneth y Kriemhild, 2001).

El Codex Alimentarius de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) define la carne como “todas

las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin” (FAO, 2021).

Aunque, habitualmente, se denomina carne sólo al músculo esquelético de los animales de sangre caliente, de acuerdo con la definición anterior también son productos cárnicos: grasa, vísceras, huesos, etc., de los animales.

La producción mundial de carne en el año 2018 fue igual a 342,40 millones de toneladas siendo la carne de cerdo es la que más contribuye al suministro mundial de carne (35%), seguida de la carne de pollo (33%) y de la carne de vacuno (20%) (FAOSTAT, 2018).

Dentro de los países con mayor consumo de carne está España (figura 2.2) con 100,25 kg/persona/año, muy por encima del consumo anual per cápita mundial de 42,57 y en la Unión Europea de 82,57 (FAOSTAT, 2017). Este hecho hace que la cantidad de residuos generados como consecuencia de ese consumo sea también muy elevada.

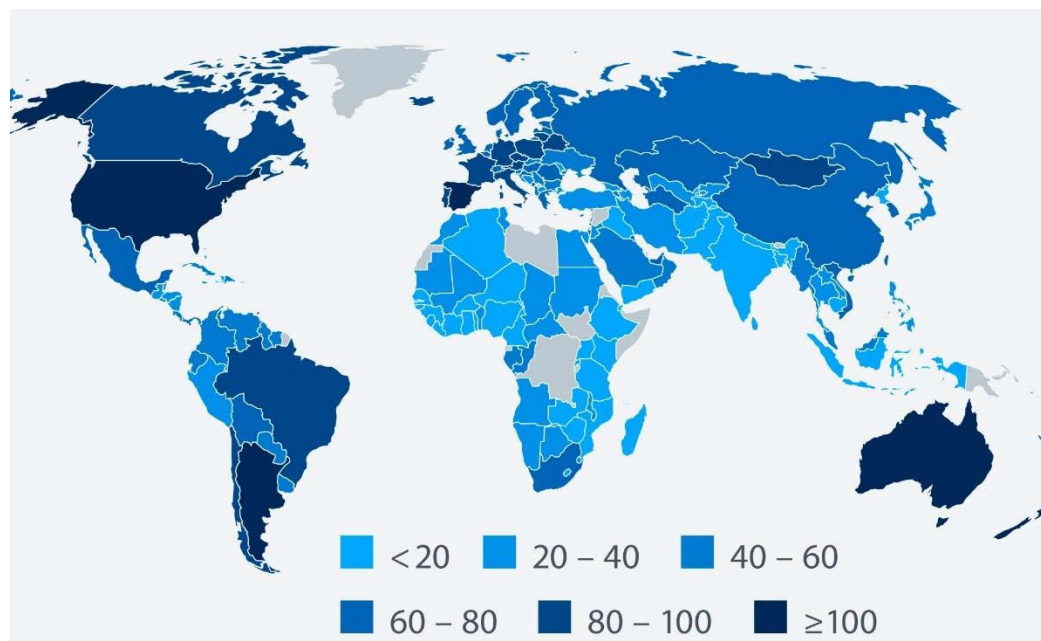


Figura 2.2. Consumo de carne per-cápita en kg/año (OWID, 2021)

Concretando en los residuos de carnicería de Castilla y León, estudios realizados hace unos años, y que son aplicables en la actualidad dado que se ha comprobado que no

han cambiado las características de la Comunidad en estos años, indicaron que se generan unos 12,8 kg por establecimiento y día, lo que hace un total de 3650 kg/día (García et al., 2005).

Estos residuos están fundamentalmente constituidos por carne (músculo esquelético), grasa, vísceras y huesos.

La carne consta aproximadamente de un 75 % de agua, un 19 % de proteína, un 2,5 % de lípidos, un 1,2 de hidratos de carbono y un 1,65 % de compuestos nitrogenados. También contiene minerales (calcio, fósforo, sodio, potasio, magnesio) y elementos traza tales como hierro, cobre, zinc y algún otro (Beltrán y Belles, 2019).

La grasa (lípidos) está constituida, fundamentalmente, por triésteres de glicerina y ácidos grasos, aunque puede tener también otros componentes como mono y diglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos libres, vitaminas solubles en grasas u otras sustancias. Los ácidos grasos presentes en las grasas son saturados, mono y poliinsaturados. La proporción de cada uno de esos tipos depende del animal del que procede la grasa, aunque, en general, entre los saturados predomina el C16:0, entre los monoinsaturados el C18:1 y entre los poliinsaturados el C18:2 (Marchello, 2016).

Las vísceras son los órganos contenidos en las principales cavidades del cuerpo de los animales. Las vísceras rojas, como el hígado, el corazón y el riñón son ricas en proteínas (en torno al 20 %), hierro, colesterol y vitaminas liposolubles A y D mientras que las vísceras blancas, como los sesos y las criadillas, son las más ricas en grasas (en torno al 10 %) aunque también tienen un contenido importante en proteínas (en torno al 10 %) (Moreiras et al., 2018).

Los huesos son un material heterogéneo compuesto de una fase mineral (fosfato cálcico análogo a la hidroxiapatita geológica) (Boskey, 2007), una fase orgánica (aproximadamente 90 % en peso de colágeno, 5 % de otras proteínas y 2% de lípidos) (Young, 2003; Gómez-Guillén et al., 2011) y agua.

De acuerdo con esto, los residuos de carnicería son ricos en proteína (con un contenido importante en colágeno) y grasa.

Las proteínas son cadenas de aminoácidos (unidades básicas) unidos por enlaces covalentes para formar cadenas de polipéptidos que se unen entre sí plegándose y formando una estructura tridimensional. En las proteínas se distinguen cuatro niveles de estructuración (Blanco y Blanco, 2017):

- Estructura primaria determinada por la secuencia de aminoácidos de la cadena proteica, es decir, el número de aminoácidos presentes y el orden en el que están entrelazado.
- Estructura secundaria determinada por la forma en la que se pliega la cadena.
- Estructura terciaria determinada por las diferentes posiciones que adoptan las cadenas en el espacio.
- Estructura cuaternaria determinada por la agrupación de varias cadenas de aminoácidos (o polipéptidos) en complejos macromoleculares mayores.

En la figura 2.3 se pueden apreciar de manera esquemática las cuatro estructuras.

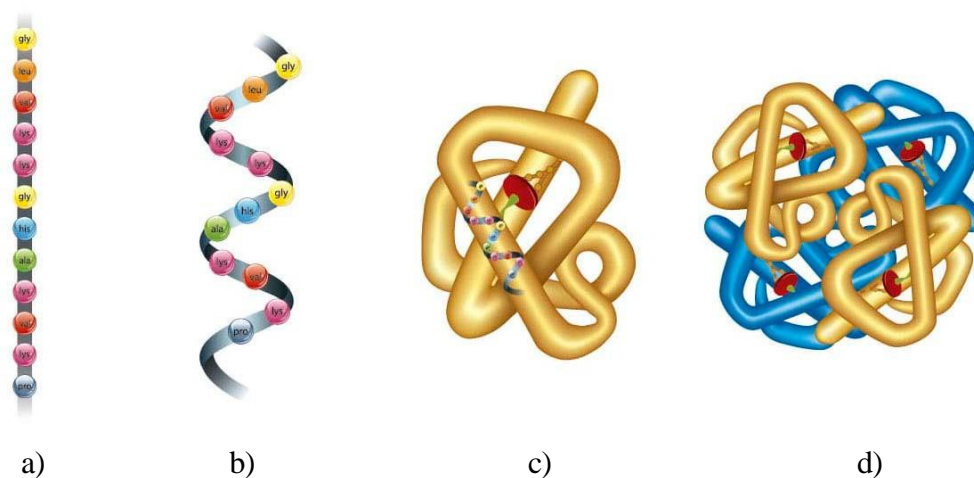


Figura 2.3. Estructura de las proteínas: a) primaria, b) secundaria, c) terciaria, d) cuaternaria

Las proteínas pueden ser globulares o fibrosas. Las proteínas globulares se pliegan en forma esférica y se diferencian de las proteínas fibrosas por ser más o menos solubles en disoluciones acuosas, siendo las fibrosas prácticamente insolubles (Blanco y Blanco, 2017). Dentro de las proteínas fibrosas se encuentra el colágeno, siendo el resto de las

proteínas presentes en los residuos cárnicos de tipo globular y, por tanto, fácilmente hidrolizables (solubles).

Las grasas (lípidos) son biomoléculas que tienen la propiedad de ser poco solubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos. Los lípidos de origen animal contienen ésteres de ácidos grasos que son ácidos orgánicos monocarboxílicos compuestos de cadenas lineales de 4 a 26 átomos de carbono (Blanco y Blanco, 2017). Como se indicó anteriormente, estos ácidos pueden ser saturados, mono y polinsaturados.

La figura 2.4 muestra la estructura lipídica.

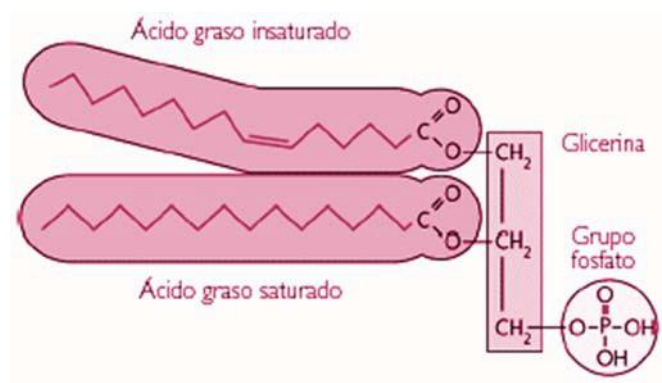


Figura 2.4. Estructura de los lípidos

Se clasifican en dos grandes categorías:

- Lípidos saponificables, cuya característica principal es la de hidrolizarse.
- Lípidos no saponificables, que no tienen capacidad de hidrolizarse.

Las grasas animales están dentro del grupo de los lípidos saponificables.

Teniendo en cuenta que en los residuos de carnicería están presentes proteínas globulares y fibrosas (colágeno) y lípidos saponificables, parece coherente pensar en la hidrólisis para su transformación en productos de mayor valor añadido como hidrolizados proteicos a partir de las proteínas globulares, ácidos grasos mediante a partir de los lípidos saponificables y recuperar el colágeno que no es hidrolizable

2. Hidrolisis enzimática

Para la separación de los componentes presentes en los residuos cárnicos se ha optado por un método que permite llevar a cabo el proceso en unas condiciones de operación suaves y sin contaminar el producto final: la hidrólisis enzimática.

En la hidrólisis enzimática se utilizan hidrolasas que son enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de un enlace químico. En comparación con los métodos tradicionales (hidrólisis ácida y alcalina), el uso de enzimas ofrece claras ventajas (Camacho et al., 1997; Pasupuleti Pasupuleti et al., 2014):

- Selectividad: No existen procesos de degradación del sustrato ya que las enzimas son selectivas para un tipo de enlace.
- Operación a pH y temperaturas moderadas: A diferencia de los métodos con ácidos o bases, los pH están comprendidos entre 5-8 y las temperaturas entre 40-60°C.
- Mantenimiento o mejora el valor nutritivo: No se produce degradación de los componentes separados.
- No adición de sustancias extrañas al medio: Después de una hidrólisis ácida o alcalina es necesario neutralizar y por tanto se eleva apreciablemente el contenido en sales.
- Fácil eliminación de la enzima: No es necesario separar la enzima ya que, para finalizar la hidrólisis, basta con su desnaturalización que se lleva a cabo mediante sencillos métodos térmicos.

Las principales variables que afectan el resultado de la hidrólisis enzimática son (Qian et al., 2011; Goswami et al., 2012; Baez et al., 2016; Jamie et al., 2017; Deng et al., 2018; Norman et al., 2018):

- Tipo de enzima
- Concentración de enzima
- Concentración de sustrato.
- pH.Temperatura.
- Tiempo de reacción.

2.2.1. Hidrólisis enzimática de proteínas

En la hidrólisis enzimática de proteínas se produce un ataque de los enlaces peptídicos de la misma por parte de la enzima de modo que, tras la adición de una molécula de agua, se forman aminoácidos y/o péptidos, siendo éstos últimos susceptibles de ser de nuevo atacados por la enzima convirtiéndose en nuevo sustrato proteico (figura 2.5).

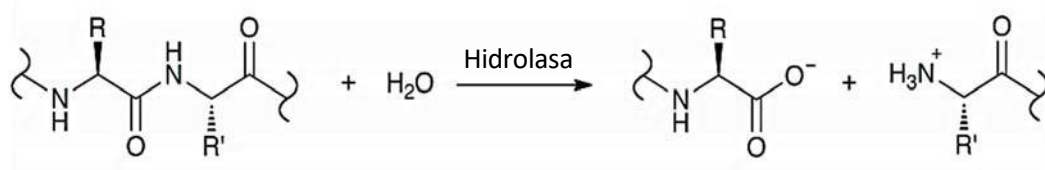


Figura 2.5. Hidrólisis de proteínas

En el proceso de hidrólisis, la enzima actúa sobre los enlaces peptídicos, favoreciendo su ruptura, y liberando grupos amino y grupos carboxilo. La liberación de estos grupos hace que el pH se modifique por lo que, para evitar cambios en él, la reacción debe llevarse a cabo en un medio tamponado o en un sistema pHestato en el que el pH se mantiene constante por adición de una base (Adler-Nissen, 1986).

La hidrólisis enzimática de proteínas se lleva a cabo a través de un conjunto de etapas en serie sin provocar reacciones paralelas de degradación de los componentes separados, como ocurre con la hidrólisis ácida o alcalina:



La clasificación de los diferentes productos originados en la reacción está basada en, fundamentalmente, en la solubilidad de las macromoléculas y, de manera aproximada, se corresponde con las masas moleculares medias, MM, y con la relación nitrógeno amino-nitrógeno total, NA/NT, que se indica en la tabla 2.1.

Tabla 2.1.- Clasificación de las macromoléculas peptídicas (Guadix et al., 2000)

COMPUESTO	MM (Dalton)	NA/NT
Proteínas	>20.000	< 0,01
Proteosomas	5.000-10.000	< 0,01
Peptonas	1.000-6.000	0,1-0,5
Péptidos	200-500	0,5-0,8
Aminoácidos	75-200	0,8-0,9

Las hidrolasas utilizadas en la hidrólisis de sustratos proteicos se denominan proteasas o peptidasas y se clasifican en función de varios criterios (Laskar y Chatterjee, 2009):

A) ORIGEN

- Origen animal: Por ejemplo, tripsina, quimotripsina, pepsina y renina. Su producción está sujeta al número de animales sacrificados en matadero.
- Origen vegetal: Por ejemplo, papaína. Su obtención necesita un tiempo considerable, además de disponibilidad de terreno y condiciones meteorológicas adecuadas.
- Origen microbiano: Fuente excelente de enzimas: rápido crecimiento, poco espacio necesario para su producción, amplia biodiversidad y susceptibilidad de ser modificadas genéticamente.

Pueden proceder de:

- Bacterias: Dentro de las enzimas de esta procedencia se distinguen las proteasas alcalinas (7-11) y neutras (5-8).
- Hongos: producen más variedad de enzimas que las bacterias, y son activas en un pH más amplio (4-11) ay que pueden ser ácidas, básicas y neutras.
- Virus: son útiles para la lucha contra el cáncer y el sida.

B) MECANISMO DE ACCIÓN

Dependiendo del lugar en el que ataquen, las proteasas se clasifican en dos grandes grupos:

- Endopeptidasas: Atacan los enlaces peptídicos dentro de la cadena de proteína. Son las más frecuentes.
- Exopeptidasas: Atacan los enlaces C o N terminales, denominándose carboxipeptidasas en el primer caso y aminopeptidasas en el segundo.

C) NATURALEZA DEL GRUPO ACTIVO:

El grupo activo puede ser un aminoácido o un metal lo que hace que se clasifiquen en:

- Serinaproteasas: El grupo activo es un aminoácido: la serina.
- Aspártico-proteasas: El grupo activo es un aminoácido: el ácido aspártico.
- Cisteína-proteasas: El grupo activo es un aminoácido: la cisteína.
- Metaloproteasas: El grupo activo es un metal. Necesitan un ion metálico divalente, como el zinc, para ser activas.

Los aminoácidos próximos al grupo activo juegan un importante papel en la hidrólisis, determinando la especificidad enzimática.

El sustrato y la proteasa empleados, así como el grado en el que la hidrólisis se produce, afectan a las propiedades del hidrolizado obtenido (Adler-Nissen, 1982; Mullally et al., 1994; Kristinsson y Rasco, 2000).

La hidrólisis enzimática de proteínas puede mejorar las propiedades físico-químicas, funcionales y sensoriales de la proteína nativa sin perjudicar su valor nutricional, por ello los hidrolizados de proteínas son ampliamente utilizados en tecnología alimentaria no sólo por sus propiedades nutricionales (van Loon, 2007), sino también por sus propiedades funcionales: solubilidad (Geirsdottir et al., 2011), poder emulsificante (Pacheco et al., 2008) o capacidad espumante (Naqash y Nazeer, 2013).

Este tipo de hidrólisis puede utilizarse como un método alternativo para la gestión de residuos industriales. Se pueden transformar subproductos o residuos de diferentes tipos de industrias en productos proteicos con distintas aplicaciones.

Así, se pueden reciclar los residuos procedentes de la industria del pescado, apareciendo en bibliografía numerosos estudios sobre la hidrólisis enzimática de residuos de diferentes tipos de pescados: gambas, cangrejos, caballa, rape, salmón, sardinas, etc. Se demuestra que se obtienen hidrolizados con un alto contenido proteico (entre el 70 y el 85%) con un perfil de aminoácidos adecuado para alimentación animal y similar al que se obtiene cuando se utiliza caseína como fuente proteica (Aspmo et al., 2005; Sumaya-Martínez et al., 2005; Bhaskar et al., 2008; Kechaou et al., 2009; Martínez-Alvarez et al., 2015). Además, estos hidrolizados también presentan propiedades funcionales (poder emulsificante, solubilidad, etc.) totalmente comparables a otras fuentes proteicas utilizadas para este fin, como puede ser la albúmina contenida en el huevo (Kristinsson y Rasco, 2000; Chalamaiah et al., 2011).

Igualmente se pueden encontrar estudios en los que hidrolizan residuos de la industria cárnica como cuernos y pezuñas (Veselá y Friedrich, 2009) o piel y lana (Gousterova et al., 2005) para su uso como fertilizantes, o bien vísceras para aplicación como suplementos nutricionales en alimentación animal (Bhaskar et al., 2007), incluso carne y huesos para alimentación o, más recientemente, para la obtención de biodiesel (Mora et al., 2014). A partir de residuos cárnicos constituidos por mezclas de carne, huesos, vísceras... también se pueden obtener hidrolizados con potenciales propiedades bioactivas como propiedades antioxidantes (Manhiani et al., 2013), reguladoras del sistema cardiovascular (Saiga et al., 2008; Lasekan et al., 2013) o ambas (Lasekan et al., 2013; Fontoura et al., 2014). Además de todo esto, los hidrolizados de estos residuos pueden aplicarse en industrias farmacéuticas, de cosméticos, de biomateriales, de alimentación o de productos nutricionales (León et al., 2019).

2.2.2. Hidrólisis enzimática de lípidos

En la hidrólisis enzimática de lípidos, la enzima ataca los enlaces lipídicos de la grasa para favorecer la adición de una molécula de agua, formándose ácidos grasos, mono y diglicéridos, sirviendo éstos últimos como nuevo sustrato lipídico susceptible de ser atacado por la enzima (figura 2.6).

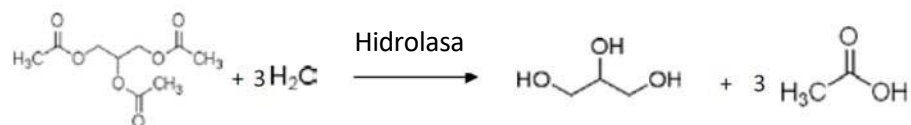
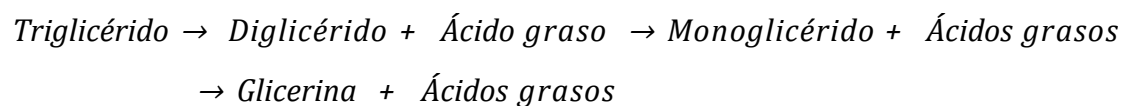


Figura 2.6. Hidrólisis de lípidos

La liberación de ácidos grasos durante el proceso origina un cambio en el pH por lo que, para evitar esta modificación, la reacción debe llevarse a cabo en un medio tamponado o en un sistema pHestato en el que el pH se mantiene constante por adición de una base (García, 2005).

La hidrólisis enzimática de lípidos también se lleva a cabo a través de un conjunto de etapas en serie produciéndose en todas ellas la obtención de ácidos grasos libres (Canakci y Gerpen, 2001):



En la hidrólisis de sustratos lipídicos, las hidrolasas utilizadas son denominadas lipasas y se clasifican en función de su origen (Ramnath et al., 2017) y de su especificidad (Zígolo, 2017):

A) ORIGEN

- Procedentes de animales e insectos: Este tipo de lipasas se obtienen del páncreas de mamíferos o de aves, de células adiposas de aves, del hígado de algunos peces o de los tejidos de los insectos. Las lipasas de origen animal son más utilizadas en diagnóstico clínico que a nivel industrial debido a que su manejo es complicado y es difícil la separación de los productos (Borrelli y Trono, 2015).
- Procedentes de plantas: Están disponibles en distintas partes de la planta (semillas, hojas, frutos, látex...) aunque se extraen fundamentalmente de las semillas porque tienen una mayor actividad lipasa. Se obtienen a partir de numerosas plantas como girasol, linaza, altramuz, trigo, arroz, maíz, avena, cebada, sésamo, sorgo... Si bien las lipasas de plantas son muy atractivas por su bajo coste, aplicaciones específicas, fácil aceptabilidad y aplicación directa como biocatalizadores, se han explorado muy pocas lipasas de plantas debido a su poca abundancia, inestabilidad y pérdida de actividad cuando se utilizan estrategias de purificación convencionales (Seth et al., 2014).
- Procedentes de microorganismos: Los microorganismos son la fuente más adecuada debido a su gran potencial a nivel industrial y a la facilidad de cultivo y manipulación (Patil et al., 2011).

Pueden ser producidas por:

- Bacterias: Las lipasas bacterianas son muy abundantes y, en general, tienen la característica de no ser específicas para un sustrato. Las lipasas procedentes del *Bacillus licheniformis* o del *Bacillus pumilus* son térmicamente estables y resultan

prometedoras como biocatalizadores en aplicaciones industriales (Rashid et al., 2013).

- Hongos: las lipasas producidas por hongos son ampliamente explotadas debido a sus cualidades únicas como estabilidad térmica y con el pH, especificidad de sustrato, bajo coste de extracción y actividad eficiente en disolventes orgánicos (Patil et al., 2011).
- Levaduras: Las lipasas producidas por levaduras tienen claras ventajas frente a las de otros orígenes debido a su fácil cultivo lo que hace que sean muy demandadas por industrias como la química, la farmacéutica, la del biodiesel... Las especies de levaduras *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Candida utilis* y *Saccharomyces* son las principales productoras de lipasas (Santos et al., 2015).

B) ESPECIFICIDAD

- Quimioselectivas: Estas lipasas tienen la capacidad de actuar selectivamente sobre un sustrato reaccionando solo con determinados grupos funcionales cuando, dentro del sustrato, existen varios distintos. Los sustratos susceptibles de interactuar con estas lipasas generalmente incluyen ácidos grasos y alcoholes (Kapoor y Gupta, 2012).
- Regioselectivas: Las lipasas regioselectivas conducen la reacción en una dirección favoreciendo la obtención de un producto frente a otro. Esa propiedad de las lipasas es muy importante en las industrias química y farmacéutica, especialmente, en la producción de isómeros (Kumar et al., 2016).
- Estereoselectivas: Estas lipasas son capaces de distinguir entre los enantiómeros de una mezcla racémica, transformando exclusivamente o con preferencia, solo una de las dos formas de enantiómero (Barros et al., 2010).

La hidrólisis catalizada por lipasas tiene ventajas respecto a los procesos convencionales de producción de ácidos grasos a partir de lípidos ya que los procesos convencionales causan una oxidación de los lípidos debido a las altas temperaturas y presiones utilizadas.

Además de llevarse a cabo en medio orgánico, las reacciones hidrolíticas catalizadas por lipasas también pueden realizarse en medio acuoso incluyéndose de ese modo dentro de los procesos respetuosos con el medioambiente (Gupta et al., 2011).

Entre los distintos tipos de lipasas de origen animal, la lipasa pancreática ha sido ampliamente utilizada en los campos de la química y la bioquímica ya que cataliza eficazmente la hidrólisis de ésteres de alcoholes primarios (Pahoja y Sethar, 2002). Las lipasas obtenidas a partir de las estrellas de mar son una alternativa a las lipasas obtenidas del páncreas porcino y tienen su principal aplicación en las industrias de procesado de alimentos.

Las lipasas derivadas de plantas encuentran su aplicación en la hidrólisis de aceites vegetales (Salaberría et al., 2017), en el procesado de semillas y aceites (Lampi et al., 2015; Zin et al., 2017), en la producción de lípidos estructurados (da Silva et al., 2017), en la producción de bebidas (Moreau et al., 2016) y en la síntesis de compuestos farmacéuticos (Hamden et al., 2017).

Las lipasas obtenidas a partir de bacterias catalizan hidrólisis de sustratos de diferentes tipos de aplicación en distintas industrias como, por ejemplo, triglicéridos de cadena larga en industrias químicas, alimentarias o de fabricación detergentes (Litantra y Yim, 2013; Laachari et al., 2015), aceites y triglicéridos en industrias de grasas y aceites (Patil et al., 2011), trioleína, tributirina o aceite de pescado en industrias alimentarias (Jaeger y Eggert, 2002; Xie et al., 2012), trilinoleína en medicina o cuidado de la salud (Strzelczyk et al., 2016), aceite residual en el tratamiento de residuos (Kanmani et al., 2015)...

Las lipasas derivadas de hongos se utilizan en la industria alimentaria y de cosméticos para la obtención de diversos compuestos producidos por hidrólisis de diferentes materias primas: semillas de soja (Abe et al., 2006), ácidos grasos de

cadena media y larga (Shukla, 2014), aceite de oliva (Sande et al., 2015), lípidos de plantas (Horner et al., 2012), aceite de cocina usado (Kumar y Negi, 2015), ésteres endógenos y grasas de la leche (Xiao et al., 2015), aceite de castor (Gomes et al., 2013)...

Por último, las lipasas generadas por levaduras también tienen aplicación en muchos campos. En el de los barnices, pinturas y cosméticos con la hidrólisis del ácido linoleico (Kobayashi et al., 2012), en el del biodiesel con la del aceite de palma (Moreno-Pirajan y Giraldo, 2011), en el de la cosmética o de la síntesis de ácidos grasos valiosos con la del aceite de oliva (Babaei et al., 2014; Santos et al., 2015), en el de la alimentación con la del aceite de soja (Cavalcanti-Oliveira et al., 2011), en el de los biosurfactantes con la de triglicéridos (Brígida et al., 2014)...

2.3. Cinética enzimática

Para poder determinar la influencia de las diferentes condiciones de operación en la hidrólisis enzimática y diseñar los reactores enzimáticos es preciso analizar la cinética del proceso.

2.3.1. Cinética enzimática simple

La cinética de las reacciones catalizadas por enzimas tiene un rasgo particular que no se aprecia en las reacciones no enzimáticas: la saturación de la enzima por el sustrato. De acuerdo con este fenómeno, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de sustrato cuando ésta es baja, pero deja de serlo a medida que aumenta dicha concentración (figura 2.7)

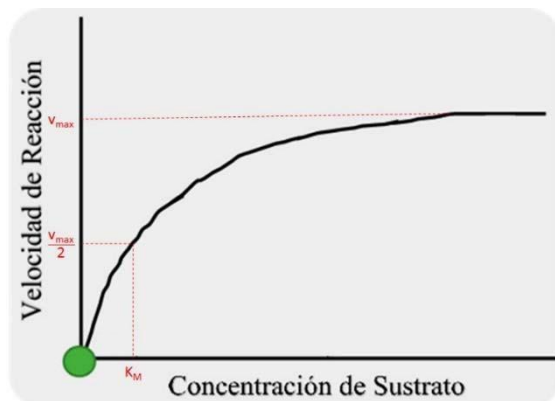


Figura 2.7. Velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato

Esto es debido a que la enzima tiene un número determinado de sitios activos a los que se puede unir el sustrato. Cuando las concentraciones de sustrato son altas, todos los sitios activos de la enzima estarán ocupados por el sustrato y la enzima estará saturada.

La cinética de saturación se puede obtener a partir de un esquema de reacción simple que implica una etapa reversible para la formación del complejo enzima-sustrato (*ES*) a partir de la enzima (*E*) y el sustrato (*S*) y una etapa de disociación del complejo enzima-sustrato para dar lugar a los productos (*P*) y liberar la enzima (figura 2.8):

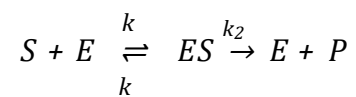


Figura 2.8. Mecanismo de la cinética enzimática

En este esquema, se considera que el complejo enzima-sustrato se establece rápidamente mientras que la velocidad de la reacción inversa de la segunda etapa es despreciable. La suposición de una segunda reacción irreversible, a menudo, se cumple solo cuando la acumulación de producto es insignificante al comienzo de la reacción.

Se han utilizado dos enfoques para desarrollar una expresión de la velocidad para las reacciones catalizadas por enzimas: la consideración de equilibrio rápido y la consideración de estado cuasi estacionario.

Ambos enfoques comparten los mismos pasos iniciales para deducir una expresión para la velocidad de formación del producto (v):

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES] \quad \text{Ec. 2.1}$$

La variación de la concentración del complejo enzima-sustrato viene dada por:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E][S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] \quad \text{Ec. 2.2}$$

Y, puesto que la enzima no se consume, la concentración inicial de enzima E_0 está en forma de enzima libre $[E]$ o formando el complejo enzima-sustrato $[ES]$:

$$E_0 = [E] + [ES] \quad \text{Ec. 2.3}$$

A partir de este momento se requiere una suposición para alcanzar una solución analítica.

2.3.1.1. Consideración de equilibrio rápido

Leonor Michaelis y Maud Menten, en 1913, supusieron un equilibrio rápido entre la enzima y el sustrato para formar el complejo ES (Michaelis y Menten, 1913; Johnson y Gody, 2011) considerando que la velocidad de ruptura del complejo para dar la enzima y el sustrato es mucho mayor que para dar la enzima y los productos ($k_{-1} \gg k_2$) por lo que utilizaron la constante de equilibrio de la reacción de formación del complejo en su mecanismo:

$$K_{sat} = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad \text{Ec. 2.4}$$

Combinando esta ecuación con la 2.1 y la 2.3 obtuvieron la siguiente ecuación de velocidad:

$$v = \frac{k_2 E_0 [S]}{[S] + K_{sat}} \quad \text{Ec. 2.5}$$

La velocidad máxima de reacción se obtiene cuando $[S] \gg K_{sat}$:

$$v = v_{max} = k_2 E_0 \quad \text{Ec. 2.6}$$

Por lo que la velocidad de reacción también puede expresarse de la siguiente forma:

$$v = \frac{v_{max}[S]}{[S] + K_{sat}} \quad \text{Ec. 2.7}$$

De acuerdo con esta ecuación, cuando $[S] = K_{sat}$, la velocidad es la mitad de la máxima. Teniendo en cuenta que la constante de Michaelis-Menten (K_m) corresponde a

la concentración de sustrato con la cual la velocidad de reacción enzimática alcanza un valor igual a la mitad de la velocidad máxima, en esas condiciones $K_{sat} = K_M$ (López y García, 2015).

2.3.1.2. Consideración de estado cuasi estacionario

En algunos casos, la suposición de equilibrio rápido no es válida, aunque la reacción enzima-sustrato presente saturación.

Por ello, George Edward Briggs y John Burdon Sanderson Haldane (1925) propusieron utilizar la suposición de estado cuasi estacionario en la que postularon que, en cualquier momento, la velocidad de formación y la de descomposición del complejo enzima-sustrato eran iguales permaneciendo constante la concentración del complejo enzima-sustrato.

En ese caso, la variación de la concentración del complejo enzima-sustrato será nula:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E][S] - k_{-1} [ES] - k_2 [ES] = 0 \quad \text{Ec. 2.8}$$

Combinando esta ecuación con la 2.3, obtuvieron la siguiente expresión para la concentración de complejo:

$$[ES] = \frac{E_0 [S]}{[S] + \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} \quad \text{Ec. 2.9}$$

Sustituyendo la ecuación 2.9 en la ecuación 2.1, llegaron a:

$$v = \frac{v_{max} [S]}{[S] + K_M} \quad \text{Ec. 2.10}$$

donde:

$$v_{max} = k_2 E_0 \quad \text{Ec. 2.11}$$

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \quad \text{Ec. 2.12}$$

La ecuación 2.12 es idéntica a la ecuación 2.7, excepto en que K_m sustituye a K_s . Si $k_2 \ll k_{-1}$ (condición que era necesaria para suponer el equilibrio), k_2 puede ser despreciada en la ecuación 2.8 y entonces $K_m = K_s$. Ambas constantes describen la concentración del complejo enzima-sustrato en términos de la concentración de enzima y de sustrato, pero K_s implica concentraciones en el equilibrio, mientras que K_m implica las concentraciones durante la catálisis (Lodeiro, 2016).

2.3.2. Cinética enzimática compleja

La cinética en los reactores enzimáticos puede llegar a ser bastante compleja. Los casos más frecuentes corresponden a la existencia de inhibición o desactivación de la enzima durante el proceso.

2.3.2.1. Inhibición enzimática

Los inhibidores son ciertos compuestos que pueden enlazarse con la enzima y reducir su actividad; suelen ser sustancias ajenas a la reacción, aunque, en ocasiones, pueden los productos o el propio sustrato de la hidrólisis. Existen dos tipos de inhibición: reversible e irreversible.

En la inhibición irreversible el inhibidor se une covalentemente a la enzima modificando sus sitios activos. En la reversible, si se elimina el inhibidor, se recupera la actividad catalítica.

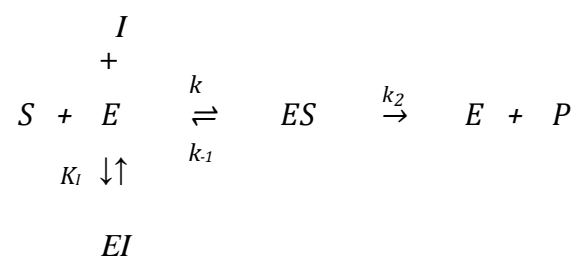
La inhibición irreversible se caracteriza por un incremento progresivo del grado de inhibición, llegando a inhibirse totalmente la enzima incluso con pequeñas concentraciones de inhibidor, siempre que éste se presente en exceso respecto a la enzima. En este caso, la eficacia del inhibidor viene dada por una constante de velocidad que determina la fracción de la enzima inhibida en un periodo de tiempo por una cierta concentración de enzima (Walsh, 2012).

Por el contrario, la inhibición reversible implica un equilibrio entre la enzima y el inhibidor, definido por una constante de inhibición que cuantifica la afinidad entre ambos. En estos procesos, el grado de inhibición depende de la concentración de inhibidor y es independiente del tiempo cuando el inhibidor es estable ya que el equilibrio se alcanza rápidamente.

Existen tres tipos de inhibición reversible: competitiva, acompetitiva y no competitiva o mixta.

- Inhibición competitiva

En este tipo de inhibición el sustrato y el inhibidor compiten por la enzima de forma que unos sitios activos de la enzima están ocupados por el sustrato y otros por el inhibidor ya que ambos no se pueden unir a ella a la vez (Strelow et al., 2021):



Considerando que los equilibrios son rápidos y que la enzima está libre o combinada con el sustrato o con el inhibidor

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad \text{Ec. 2.13}$$

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad \text{Ec. 2.14}$$

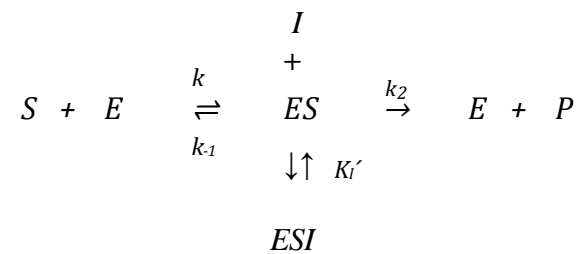
$$E_o = [E] + [ES] + [EI] \quad \text{Ec. 2.15}$$

y utilizando la ecuación 2.1, se obtiene la ecuación cinética correspondiente este mecanismo (Lu et al., 2017):

$$v = \frac{v_{max}[S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K}\right)} \quad \text{Ec. 2.16}$$

- Inhibición acompetitiva

En este caso el inhibidor se une al complejo enzima-sustrato, pero no tiene ninguna afinidad por la enzima en sí misma (Strelow et al., 2021):



Con las ecuaciones de las constantes de equilibrio y de la concentración de enzima inicial:

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad \text{Ec. 2.17}$$

$$K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad \text{Ec. 2.18}$$

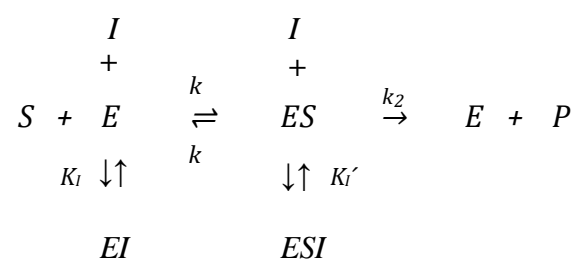
$$E_o = [E] + [ES] + [ESI] \quad \text{Ec. 2.19}$$

y la ecuación 2.1, se desarrolla la siguiente ecuación cinética para la inhibición acompetitiva (Palmer y Bonner, 2014):

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Ec. 2.20}$$

- Inhibición no competitiva o mixta

En la inhibición no competitiva el inhibidor puede unirse tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato (Strelow et al., 2021):



Combinando las ecuaciones de las constantes de equilibrio y de la concentración de enzima inicial:

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad \text{Ec. 2.21}$$

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad \text{Ec. 2.22}$$

$$K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \quad \text{Ec. 2.23}$$

$$E_o = [E] + [ES] + [EI] + [ESI] \quad \text{Ec. 2.24}$$

con la ecuación 2.1, se alcanza la ecuación cinética para la inhibición mixta (Das et al., 2020):

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K} + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K}\right)\right)} \quad \text{Ec. 2.25}$$

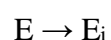
2.3.2.2. Desactivación enzimática

Cuando se trabaja con enzimas “in vitro” es muy frecuente que se produzca desactivación de las mismas. La desactivación enzimática implica una disminución de la concentración total de enzima activa a lo largo de la reacción y puede considerarse sinónimo de desnaturalización (Polakovič et al., 1998).

La desactivación de las enzimas puede deberse a diferentes factores como el calor (Ahnoff et al., 2015), los agentes químicos (Perez-Won et al., 2020), la luz ultravioleta (Lante t al., 2013), los ultrasonidos (Rojas et al., 2016) ... Las modificaciones de las propiedades que se producen habitualmente son disminución de la solubilidad, alteración de la estructura interna y reordenamiento de las cadenas peptídicas, modificación de la estructura secundaria, aumento en la reactividad química y disminución o pérdida total de la actividad catalítica (Bhagavan, 2002).

Esa desactivación puede ser reversible de forma que, cuando el agente que la causa deja de actuar, la enzima recupera sus propiedades, o puede ser irreversible cuando, aunque el agente causante deje de actuar, la enzima no logra recuperar sus propiedades anteriores (Polakovič et al., 1998).

Se han propuesto modelos muy diferentes para describir la desactivación enzimática. El modelo más simple y utilizado es el que sucede en una sola etapa en la que la forma nativa de la enzima (activa) se transforma en la forma desactivada siguiendo una reacción unimolecular e irreversible (Serment-Moreno et al., 2014):



El proceso entonces sigue una cinética de orden uno, en la que la pérdida de actividad sigue un modelo exponencial:

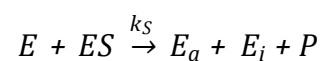
$$\frac{A}{A_0} = e^{(-k_d t)} \quad \text{Ec. 2.26}$$

donde A es la activación a un tiempo t , A_0 es la actividad inicial y k_d es la constante de desactivación.

Otros autores describen la desactivación mediante una reacción simple siguiendo una cinética de orden dos (Zapata et al., 2018):

$$\frac{1}{A} - \frac{1}{A_0} = k_d t \quad \text{Ec. 2.27}$$

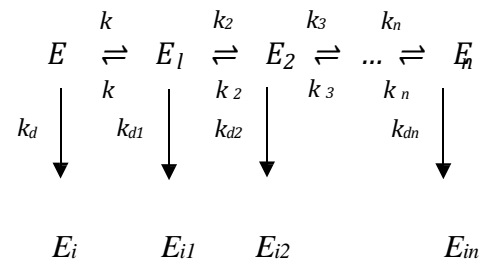
o bien mediante una cinética de segundo orden, por ataque de la enzima libre a la enzima ligada al sustrato (Ruan et al., 2010):



$$\frac{d[E]}{dt} = -k_d [E] [ES] \quad \text{Ec. 2.28}$$

Estos sencillos modelos no siempre son aplicables debido a la complejidad de la desactivación enzimática, por lo que también se han propuesto mecanismos más complejos (Aymard y Belarbi, 2000; Perdana et al., 2012).

Henley y Sadana (1985), propusieron un esquema general para la desactivación:



donde E es la forma activa de la enzima, $E_1, E_2, E_3 \dots$ son formas intermedias de la enzima, $E_i, E_{i1}, E_{i2} \dots$ son formas desactivadas de la enzima, $k_1, k_2, k_3 \dots$, y $k_{-1}, k_{-2}, k_{-3} \dots$ son constantes cinéticas de primer orden y $k_d, k_{d1}, k_{d2} \dots$ son constantes de desactivación.

De acuerdo con esos autores, la expresión matemática para la pérdida total de actividad será:

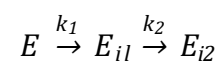
$$\frac{A}{A_0} = cp_1 e^{-\lambda_1 t} + cp_2 e^{-\lambda_2 t} + cp_3 e^{-\lambda_3 t} + \dots + cp_n e^{-\lambda_n t} \quad \text{Ec. 2.29}$$

donde $cp_1, cp_2, cp_3 \dots$ son las constantes de integración y $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3 \dots$ dependen de las constantes cinéticas y de desactivación.

Esta expresión se puede simplificar dando lugar a dos tipos de modelos diferentes (Illanes y Altamirano, 2008):

- Modelos en serie:

La forma activa de la enzima se transforma en la desactivada a través de una secuencia de reacciones de primer orden.



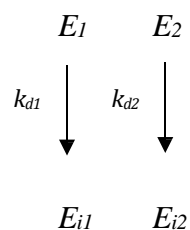
Considerando que, como suele ser habitual, a tiempo cero toda la enzima está en la forma activa (E) y que las etapas son irreversibles, para un mecanismo con dos etapas la ecuación 2.29 se simplifica a:

$$\frac{A}{A_0} = \delta_1 e^{-k_1 t} + \delta_2 e^{-k_2 t} + \gamma_2 \quad \text{Ec. 2.30}$$

expresión en la que el valor de los parámetros δ depende de las constantes cinéticas y de la actividad específica de cada enzima intermedia respecto a la inicial (γ).

- Modelos en paralelo:

Se aplican cuando existen dos formas activas de la enzima (isoenzimas) con diferente susceptibilidad a la desactivación y cada una de ellas tiene una desactivación unimolecular de primer orden con sus propios parámetros cinéticos:



Considerando el caso sencillo de dos isoenzimas activas, la ecuación 2.29 se reduce a:

$$\frac{A}{A_0} = \phi_1 e^{-k_{d1} t} + \phi_2 e^{-k_{d2} t} \quad \text{Ec. 2.31}$$

donde los parámetros ϕ_1 y ϕ_2 son función de la actividad específica de cada enzima respecto a la inicial y de la relación entre las concentraciones de cada isoenzima.

2.4. Optimización del proceso enzimático

En algunas ocasiones, no se obtienen las respuestas buscadas en los experimentos de hidrólisis enzimática realizados o el nivel de mejora alcanzado no es suficiente por lo que es preciso experimentar secuencialmente hasta alcanzar el nivel deseado.

En esas condiciones, después de la primera etapa experimental será preciso desplazar la región experimental en la dirección apropiada o explorar más detalladamente la región experimental inicial (figura 2.9). El modo de llevar esto a cabo está comprendido en la metodología de superficie de respuesta.

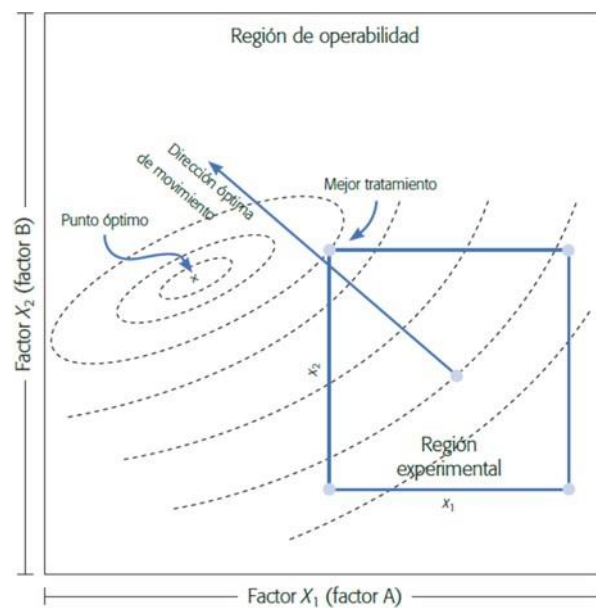


Figura 2.9. Desplazamiento de la región experimental para la optimización del proceso (Fuente: Gutiérrez y de la Vara, 2008)

2.4.1. Análisis de superficies de respuesta

El análisis de superficie de respuesta incluye una serie de procedimientos matemáticos y estadísticos enfocados a establecer un óptimo local o absoluto para un intervalo de las variables experimentales ensayadas (Gutiérrez y de la Vara, 2008).

2.4.1.1. Fundamento matemático de las superficies de respuesta

Cuando se estudia un fenómeno cuantificable por una variable de respuesta medible experimentalmente Y , dicha variable dependerá a su vez de otras variables denominadas factores (X), de modo que se puede establecer la siguiente relación:

$$Y = f(X_1, X_2, X_3, \dots, X_n, E) \quad \text{Ec. 2.32}$$

donde ε es el error experimental asociado a la medición de la variable de salida y de los factores.

Los modelos usados en la metodología de superficie de respuesta son fundamentalmente polinomios que estudian el comportamiento de Y (variable de respuesta) con respecto a X (factores significativos) mediante un modelo de regresión ajustado a un esquema matemático que permite comprobar simultáneamente el efecto de diversas variables con un mínimo de ensayos (Ovalles, 2011).

Dichos polinomios podrán ser de primer grado, representando la ecuación de un plano (figura 2.10):

$$Y = f_0 + \sum_{i=1}^n f_i X_i + \sum_{i,j}^n f_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Ec. 2.33

o de segundo grado o superior, ajustando la respuesta a superficies curvas (figura 2.11):

$$Y = f_0 + \sum_{i=1}^n f_i X_i + \sum_{i < j} f_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n f_{ii} X_i^2 + \varepsilon$$

Ec. 2.34

donde β_0 es un término constante, β_i son los parámetros del modelo que afectan al factor X_i y β_{ij} son los parámetros de interacción entre el factor X_i y el factor X_j .

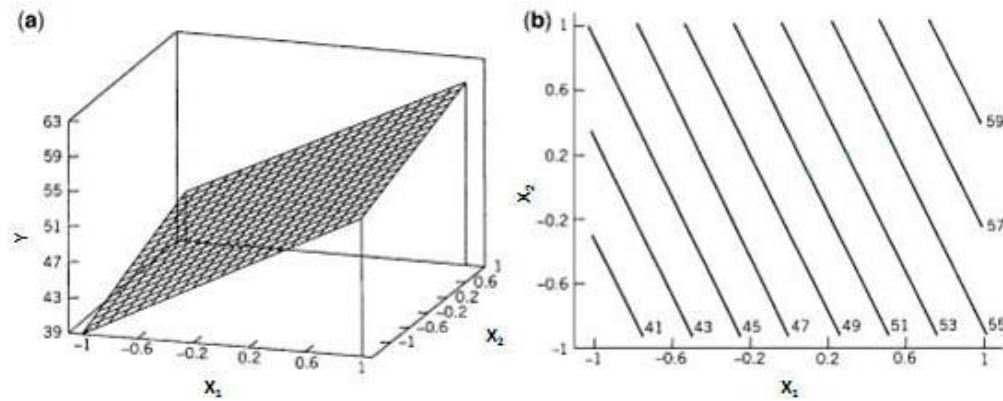


Figura 2.10. Superficie de respuesta (a) y gráfico de contorno (b) de un modelo de primer orden

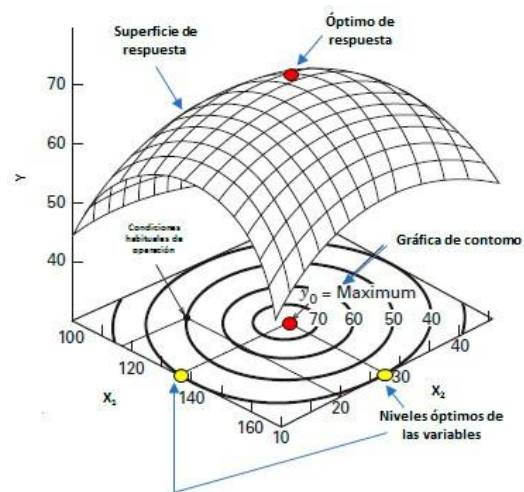


Figura 2.11. Superficie de respuesta tridimensional y gráfico de contornos correspondiente

Una vez determinados los valores de los parámetros β_1, \dots, β_n por regresión múltiple, es posible estimar el vector (X_1, \dots, X_n) que hace óptimo (máximo o mínimo) el valor de la respuesta Y .

Se trata de resolver un sistema de ecuaciones diferenciales de acuerdo con

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial Y}{\partial X_1} = 0 \\ \frac{\partial Y}{\partial X_2} = 0 \\ \dots\dots\dots \\ \frac{\partial Y}{\partial X_n} = 0 \end{array} \right.$$

Ec. 2.35

Hay numerosos programas que permiten obtener superficies de respuesta. En general, sirve cualquier programa que incorpore un algoritmo de ajuste por regresión múltiple como Statgraphics, SPSS, MODE, Matlab...

En ciertas ocasiones, la región inicial seleccionada no contiene al óptimo absoluto de la variable respuesta Y , de modo que es necesario cambiar el rango inicial de los factores para conseguir el desplazamiento a una región adyacente donde ensayar la nueva superficie de respuesta (Rojas et al., 2012). En esas circunstancias es útil el vector de máxima pendiente, que indica la dirección en la que se produce el ascenso más pronunciado de la variable de salida (Montgomery, 2019). Matemáticamente, dicho vector representa el gradiente de la función respuesta.

$$\left(\frac{\partial Y}{\partial X_1}, \frac{\partial Y}{\partial X_2}, \dots, \frac{\partial Y}{\partial X_n} \right) \quad \text{Ec. 2.36}$$

Estas coordenadas permiten desplazar el centro de la región inicial hasta un nuevo punto, de modo que vuelva a ajustar la variable respuesta a un nuevo rango de factores experimentales, y así obtener un nuevo óptimo.

2. Diseño de experimentos

Cualquier superficie de respuesta parte de una región inicial, con unos intervalos determinados en los factores experimentales, a partir de los cuales se realiza la evaluación para optimizar posteriormente la variable de respuesta Y.

El objetivo primordial del diseño experimental es elegir el número y la disposición de los factores experimentales de modo que representen de forma rigurosa la región a estudiar.

Se pueden distinguir los siguientes diseños principales:

- *Diseños factoriales completos.* Los diseños factoriales completos parten de un número de factores (k) y un número de niveles que usualmente suele ser 2 ó 3 ($2^k, 3^k$) (Gutiérrez y de la Vara, 2008). Su utilización está limitada por el tiempo y los recursos necesarios que están definidos por el número de experimentos: un diseño 2^2 requiere, por ejemplo, cuatro experimentos, un diseño 2^3 requiere ocho, un diseño 2^4 requiere dieciséis y así sucesivamente. Todo ello sin tener en cuenta las repeticiones que hay que realizar de cada experimento para determinar la desviación estándar y para comprobar la validez del modelo.
- *Diseños factoriales fraccionarios.* El número de experimentos a realizar viene dado la potencia 2^{k-p} o 3^{k-p} , siendo k el número de factores que se considerarán en el modelo, y p la fracción de puntos elegidos entre el total que son potencialmente susceptibles de ser ignorados respecto a los k diseño factorial completo (Montgomery, 2019). Son menos complejos dada la reducción del número de experimentos ya que, con realizar una parte de estos, ya se puede tener una idea de algunas interacciones de los factores y estimar efectos principales

- *Diseños robustos.* Consideran que en un experimento existen factores de ruido (no controlables) considerados de manera explícita o implícita, cuyo efecto se pretende minimizar indirectamente (es decir, sin controlarlo directamente), con el objetivo de encontrar la combinación de niveles de los factores de proceso que sí se pueden controlar, y en donde el efecto de dichos factores de ruido es mínimo (Taguchi et al., 2005). El objetivo fundamental de un diseño robusto es establecer la combinación de niveles de los factores controlables, para la que los factores de ruido no afecten al proceso, aunque estos no se controlen. El concepto de “robusto” se utiliza aquí en el sentido de hacer el proceso insensible o resistente a factores de ruido que no se pueden controlar. Este tipo de diseño fue desarrollado por el Dr. Taguchi por lo que, habitualmente, los diseños robustos se denominan Diseño de Taguchi.

En un proceso se distinguen tres tipos de factores (figura 2.12): factores de control cuyos niveles son establecidos por el experimentador (parámetros de diseño), factores de ruido o no controlables y factores de señal que cambian a discreción de los requerimientos del supra sistema (el usuario, por ejemplo) y solo son aplicables en los experimentos dinámicos.

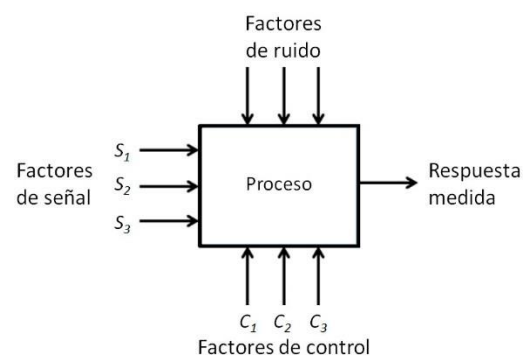


Figura 2.12. Factores de un proceso

Esos factores pueden afectar a la media y a la varianza, solo a la varianza, solo a la media, o no afectar a la media ni a la varianza. En los diseños factoriales, cuando se

afirma que un factor tiene efecto sobre la respuesta, por lo general se quiere decir que el factor tiene efecto sobre la media. En el diseño robusto, ese efecto puede ser tanto sobre la media como sobre la variabilidad o sobre ambas simultáneamente.

Los diseños generados con los tres métodos son similares. Sin embargo, el método Taguchi es el más rápido, eficiente y económico para optimizar un proceso (Hernández et al., 2015). El diseño de los parámetros permite determinar:

- Los niveles óptimos de factores que influyen en un proceso.
- La influencia de cada uno de los diferentes factores en el proceso con un cierto nivel de confianza.
- Los niveles de cada factor que aseguran una menor variabilidad del proceso frente a cambios externos no controlados, es decir, asegurar la robustez del proceso.
- Los niveles de los factores que ofrecen un comportamiento más lineal del proceso.

Para llevar a cabo el diseño de Taguchi es preciso identificar la variable a optimizar y seleccionar los factores que influyen en el proceso pero, además, se propone el concepto de *índice señal-ruido* (S/N) para la detección de la variabilidad no deseable (Castaño y Domínguez, 2010). Este índice se calcula de diferente forma en función del objetivo que se quiera alcanzar para la variable analizada: menor es mejor, mayor es mejor, o nominal es mejor (Taguchi et al., 2005).

La relación S/N utilizando criterios de "mayor-mejor" se calcula de acuerdo con la ecuación (Pagura et al., 2009):

$$S_N = -10 \log \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right) \quad \text{Ec. 2.37}$$

La relación S/N utilizando criterios de "menor-mejor" se calcula de acuerdo con esta otra ecuación (Pagura et al., 2009):

$$S_N = -10 \log \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2 \right) \quad \text{Ec. 2.38}$$

La relación S/N utilizando criterios de "nominal mejor" se calcula de acuerdo con otra ecuación diferente (Pagura et al., 2009):

$$S_N = 10 \log \left(\frac{\bar{y}^2}{s^2} \right) \quad \text{Ec. 2.39}$$

donde n es el número de pruebas en un experimento, y_i es la respuesta experimental a la i -repetición y s^2 es la varianza de los valores experimentales.

2.4.2. Utilización de las superficies de respuesta en la optimización de la hidrólisis enzimática

El método de superficies de respuesta ha sido muy utilizado en la optimización de los procesos de hidrólisis enzimática. Dado que de la hidrólisis enzimática de productos cárnicos y sus residuos hay pocos estudios realizados, por su analogía en cuanto a composición, se va a incluir también una breve revisión bibliográfica de la hidrólisis de pescados y sus residuos para dar una idea clara de la amplia aplicación, desde hace unos años, del método de superficies de respuesta en la optimización de este tipo de procesos.

Silva et al. (2010) estudiaron la hidrólisis de la carne de mejillón con Protamex en entre 46 y 64°C, para pH ente 6,7 y 8,3, utilizando relaciones enzima/sustrato de 0,48 a 5,52 % y determinando el grado de hidrólisis. La metodología de superficies de respuesta indicó que las condiciones óptimas eran pH de 6,85, 51°C y relación enzima/sustrato de 4,5 %. En estas condiciones se alcanzó un grado de hidrólisis del 26,5 % y una recuperación de proteína del 65 %.

Mohammad et al. (2015) analizaron la influencia de la temperatura (50-60°C), el tiempo (25-95 min) y la relación enzima/sustrato (0,1-1,9 % v/w) en el grado de hidrólisis de tipalia con Alcalase 2.4L. La optimización del proceso, llevada a cabo con el método de superficies de respuesta, indicó que el mayor grado de hidrólisis (10,91 %) y la mayor recuperación de proteína (85.26 %) se obtenían a los 80 minutos manteniendo la temperatura a 57,6°C y trabajando con una relación enzima/sustrato de 1,20 % v/w.

Halim y Sarbon (2016) optimizaron la hidrólisis de anguila utilizando también Alcalase 2.4L. Los estudios fueron realizados en los intervalos de 40-60°C para la

temperatura, 7-9 para el pH y 1-3 % para la concentración de enzima. Las condiciones óptimas de hidrólisis determinadas por el método de superficies de respuesta fueron 55,76°C, pH de 9 y un 1,80 % de enzima permitiendo obtener un grado de hidrólisis del 15,01 %.

Ji et al. (2016) estudiaron la hidrólisis de corvina con papaína utilizando un diseño experimental de cuatro variables: tiempo (3-5 h), concentración de enzima (0,2-0,4 %), temperatura (50-55°C) y relación sustrato/agua (1:3-1:5). Los resultados obtenidos con el método de superficies de respuesta indicaron un máximo grado de hidrólisis (49,37 %) trabajando a 57,75°C durante 3,89 h, para una concentración de enzima del 0,22 % y una relación sustrato/agua de 1:5.

Herpandi et al. (2017) se propusieron como meta optimizar la hidrólisis del bonito con Protamex. Las condiciones de operación utilizadas fueron: concentración de enzima (1,0-2,5%), temperatura (40-60°C) y tiempo (2-6 h). El análisis de las superficies de respuesta permitió determinar que el proceso era óptimo (grado de hidrólisis de 18,48 %) para un pH de 6,57, una temperatura de 58°C y 4 horas.

Rasimi et al. (2020) hidrolizaron el pez cabeza de serpiente con Alcalase 2.4L entre 60 y 180 minutos, a temperaturas de 45 a 65°C, pH de 8 a 10, y relación enzima/sustrato del 1 al 3 %. Las condiciones experimentales para el mejor rendimiento (9,48 %) se optimizaron por superficies de respuesta para un tiempo de 154,26 min, una temperatura de 46,84°C, pH de 8,46 y una relación enzima/sustrato de 1,04.

En el estudio de los residuos de pescado también se utilizó la metodología de superficies de respuesta.

Así, Bhaskar et al. (2008) estudiaron la hidrólisis de residuos de vísceras de carpa con Alcalase. Las condiciones de hidrólisis (tiempo 45-165 min, temperatura 35-55°C, pH 7-9, y relación enzima/sustrato 0,5-1,5 % v/w) fueron optimizadas por superficies de respuesta obteniendo el mayor grado de hidrólisis (próximo al 50 %) a los 50°C, 135 minutos, un pH de 8,5 y una relación enzima/sustrato del 1,5 % v/w.

Dumay et al. (2009) trabajaron con cabezas de sardina hidrolizándolas con Protamex durante tiempos entre 29 y 1651 minutos, a temperaturas de 31 a 50°C y para relaciones enzima/sustrato 0,2-2,8 g/kg. En este estudio no sólo se obtuvo el hidrolizado,

sino que también se recuperaron los lípidos presentes en las cabezas. Las condiciones óptimas de liberación de lípidos (0,239 g/g) y de máximo grado de hidrólisis (> 30 %) determinadas por superficies de respuesta fueron: 29 min, 31°C y 2,6 g/kg.

Rodríguez-Díaz et al. (2011) hidrolizaron piel de tiburón también con Protamex analizando la influencia de la temperatura (45-65°C), el pH (6,8-8,0) y la relación enzima/sustrato (1%-5%). Las condiciones óptimas establecidas por superficies de respuesta (51°C, pH = 7,1 y relación enzima/sustrato del 4%) dieron un grado de hidrólisis del 19,3 % y una recuperación de proteína del 90,3 %.

Roslan et al. (2015) prepararon hidrolizados a partir de subproductos de tilapia (cabezas, colas, espinas) utilizando Alcalase 2.4L como enzima. Bajo las condiciones óptimas de hidrólisis determinadas por el método de superficies de respuesta (pH de 7,5, temperatura de 60°C, concentración de sustrato del 15 % w/v y de enzima del 2,5 % w/w) se obtuvo el mayor grado de hidrólisis (20,20 %) una vez transcurridos 120 minutos de hidrólisis. Los intervalos estudiados para las variables fueron los siguientes: temperatura 55-70°C, concentración de sustrato 10,0-17,5 % w/v, concentración de enzima 1,5-3,5 % w/w y pH 6,5-8,5.

Qi-yuan et al. (2016) utilizaron una proteasa neutra para extraer el aceite de las vísceras de caballa trabajando con tres variables: pH (6,0-7,5), concentración de enzima (0,8-1,0 %) y temperatura (35-45°C). La optimización determinada por superficies de respuesta indicó que la mayor extracción (78,66 %) se obtenía cuando el pH era 7,3, la concentración de enzima 1 % y la temperatura 44,8°C.

Zapata et al. (2019) compararon el grado de hidrólisis de vísceras de trucha arcoíris alcanzado con tres enzimas: Alcalase 2.4L, Flavourzyme y Neutrase. El mayor grado de hidrólisis se alcanzó con la Alcalase para la cual se optimizó el proceso en función de la temperatura (45-65°C) y el pH (7,5-9,5). El método de superficies de respuesta se empleó para fijar el grado de hidrólisis máximo que fue del 24 % para un pH del 8,5 y una temperatura de 45°C.

En cuanto a los estudios con carne, Kurozawa et al. (2008) hidrolizaron carne de pechuga de pollo con Alcalase 2.4L evaluando la influencia de la temperatura (43-77°C), la relación enzima/sustrato (0,8-4,2 % w/w) y pH (7,16-8,84) sobre el grado de hidrólisis

y la recuperación de proteína. Se optimizó la hidrólisis utilizando el método de superficies de respuesta obteniendo el máximo grado de hidrólisis (31 %) y la mayor recuperación de proteína (91 %) a los 52,5°C, para una relación enzima/sustrato del 4,2 % w/w y a un pH de 8,0.

Teng et al. (2009) hidrolizaron la grasa de pollo con una lipasa de *Candida cylindracea* trabajando con concentraciones de enzima entre 0,20 y 0,71 g de enzima por 100 g de grasa, agitaciones entre 30 y 106 rpm, temperaturas entre 30 y 50°C, y tiempos de hidrólisis entre 23 y 178 minutos. El máximo rendimiento de ácidos grasos liberados (en torno al 94 %) se obtuvo a partir del método de superficie de respuesta para 0,48 g de enzima por 100 g de grasa, 38°C, 100 rpm y un tiempo de reacción de 80 minutos.

Wang et al. (2018) estudiaron la hidrólisis de carne de pato con Flavourzyme. Las variables analizadas en este trabajo fueron: pH (5,0-7,5), temperatura (36-60°C) y tiempo (0,5-3,0 h). De acuerdo con el análisis de superficies de respuesta, las condiciones óptimas de hidrólisis correspondieron a un pH de 5,45, una temperatura de 50,19°C y un tiempo de 1,03 horas.

También se ha aplicado la metodología de superficies de respuesta en el estudio de los residuos de carne.

Linder et al. (2006) utilizaron una enzima comercial para hidrolizar huesos triturados analizando la influencia de la temperatura (desde 40 hasta 60°C), el pH (desde 5,7 hasta 7,5), la concentración de enzima (desde 20 hasta 80 g/kg de proteína), el tiempo de hidrólisis (desde 30 hasta 180 minutos) y la concentración de proteína (desde 60 hasta 90 g/kg de residuo). La metodología de superficies de respuesta predijo cambios en la recuperación de proteína y en el grado de hidrólisis indicando que la duración de la hidrólisis y la concentración de enzima eran los parámetros más importantes mientras que el pH y la temperatura no presentaban efectos significativos.

Taheri et al. (2011) determinaron las condiciones óptimas de producción de un hidrolizado de residuos de aves (cabezas y patas) utilizando Alcalase 2.4L como catalizador. La relación enzima/sustrato, el tiempo y la temperatura fueron las variables ensayadas. El análisis de superficies de respuesta determinó que las condiciones para las que se obtenía un grado de hidrólisis óptimo (26,14 %) correspondían a una relación

enzima/sustrato de 0,05UA/g de proteína, un tiempo de 85,63 minutos y una temperatura de 45,53°C.

Zhang et al., (2014) llevaron a cabo estudios de hidrólisis de huesos de oveja, cordero y cerdo con pepsina, papaína y tripsina, estudiando la influencia de la concentración de enzima (3500-11500 UA/g), la temperatura (32,5-82,5°C), el pH (3,25-8,25) y el tiempo (2-5 h). Los resultados de optimización del proceso obtenidos a partir de las superficies de respuesta indicaron que la papaína era más la enzima más adecuada y que las condiciones operación idóneas eran 82,5°C, 2,75 horas de hidrólisis, cantidad de enzima igual a 11500 UA/g y pH de 3,25.

Stiborova et al. (2019) hidrolizaron residuos de aves (espinazos, cuellos, esqueletos, restos de carne) con pepsina y papaína en medio tamponado. Optimizaron, mediante el método de superficies de respuesta, las condiciones de hidrólisis en cuanto a enzima añadida, tampón y duración de la hidrólisis con la finalidad de obtener, principalmente, ácido hialurónico. Los resultados obtenidos recomiendan utilizar alrededor de 35 g de papaína, 55 ml de tampón e hidrolizar durante 9 horas para una cantidad de 5 kg de residuos.

Ly y Yu (2019) estudiaron la hidrólisis con pepsina del rumen de yak para extraer el colágeno. La cantidad de pepsina varió entre el 0,5 y el 1,5 %, el tiempo de hidrólisis entre 16 y 24 horas, y la relación sólido-disolvente entre 1:6 y 1:14. La optimización del proceso por el método de superficies de respuesta indicó que la mayor extracción de colágeno (3,62/100 g) se alcanzaba para una cantidad de pepsina añadida de 0,95 %, un tiempo de reacción de 21 horas y una relación sólido-disolvente de 1:11.

Maluf et al. (2020) obtuvieron hidrolizados a partir del hígado de cerdo. Utilizando Alcalase 2.4L y Novo Pro-D como catalizadores analizaron la influencia de las relaciones proteína-agua (8,0-22,1 % w/w) y enzima-sustrato (0,3-1,7 % w/w). La metodología de superficies de respuesta indicó que la hidrólisis óptima, para la cual se obtenía un grado de hidrólisis del 27,85 % con Alcalase y del 27,30 % con Novo Pro-D, correspondía en ambos casos a relaciones de 20 gramos de proteína por 100 gramos de agua y 1,5 gramos de enzima por 100 gramos de sustrato.

CAPÍTULO III: OBJETIVOS

3. Objetivos

Tal y como se ha comentado con anterioridad, la imposibilidad existente en los Centros de Tratamiento de Residuos de la Comunidad de Castilla y León de reducir la fracción biodegradable depositada en vertedero, de modo que pueda cumplirse la legislación vigente tanto a nivel europeo como nacional, ha sido la razón que ha llevado a plantear una investigación cuyo **objetivo general** es encontrar una alternativa en la gestión de los residuos urbanos que permita el cumplimiento de dicha legislación.

Dentro del marco de este objetivo general, los objetivos específicos han estado encaminados a la separación en origen del componente orgánico de esa fracción y a su posterior tratamiento para la obtención de subproductos con elevado valor añadido.

En este sentido, los **objetivos específicos** planteados y la justificación de los estudios realizados para alcanzar dichos objetivos han sido los siguientes:

- **Selección y caracterización la fracción orgánica:**

Como se ha comentado, la fracción orgánica preseleccionada han sido los residuos de carnicerías debido a estudios previos realizados por el grupo de investigación denominado Gestión Ambiental y Aprovechamiento de Recursos en cuyas investigaciones está incluida esta tesis. En dichos estudios se determinó la existencia de una elevada cantidad de estos residuos generada en la Comunidad de Castilla y León y se comprobó que su composición estaba formada, casi exclusivamente, por proteínas y lípidos. Estos residuos deben ser recogidos de modo que la muestra sea representativa y deben ser caracterizados previamente a su tratamiento. Para la toma de muestras se ha elegido un comercio de la ciudad de Salamanca que, en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, resultó representativo de los residuos cárnicos de Castilla y León.

La caracterización consistió en la determinación, en los residuos de carnicerías, del contenido en:

- Humedad
- Proteínas
- Lípidos
- Fibra

- Hidratos de carbono
- Cenizas
- Colágeno

así como:

- Composición en ácidos grasos
- Densidad
- Índice de saponificación

El sustrato no se analizó en cuanto a patógenos porque estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación demostraron que los patógenos existentes en los residuos cárnicos podían eliminarse por calentamiento a 65°C durante 20 minutos y en el proceso, para la terminación de la reacción de hidrólisis, fue preciso calentar la mezcla a ebullición a unos 95-97°C durante varios minutos para desactivar la enzima. Este calentamiento es más que suficiente para higienizar el producto.

- **Selección de las enzimas para el tratamiento:**

El tratamiento elegido para llevarse a cabo fue la hidrólisis enzimática por su capacidad de permitir la obtención de subproductos con alto valor añadido, como son hidrolizados proteicos y colágeno así como lípidos y ácidos grasos, en condiciones de operación suaves. Para ello, se seleccionaron las enzimas más adecuadas para el proceso de separación y recuperación de los subproductos deseados.

Se utilizaron dos tipos de enzimas:

- Proteasas para la transformación de la fracción proteica del residuo.
- Lipasas para la transformación de la fracción lipídica del residuo.

Dentro de cada tipo (proteasas y lipasas) se ensayaron varias enzimas para determinar con cuál se obtenía mejor rendimiento en el proceso.

- **Optimización del tratamiento con las enzimas individualmente:**

Una vez seleccionadas las enzimas que dieron los mejores resultados, se obtuvieron las condiciones de operación más adecuadas para la optimización del proceso objeto de estudio. Este apartado se dividió en dos partes:

- Optimización del tratamiento con proteasa.
- Optimización del tratamiento con lipasa.

En ambos casos se analizó la influencia de las siguientes variables:

- Tiempo de reacción
- Concentración inicial de enzima
- Concentración inicial de sustrato
- Relación concentración inicial de enzima/concentración inicial de sustrato
- pH
- Temperatura

y se midieron los siguientes parámetros:

- Grado de hidrólisis de proteínas o de lípidos
- Porcentaje de residuo no solubilizado
- Porcentaje de proteína solubilizada
- Porcentaje de colágeno no hidrolizado
- Porcentaje de lípidos recuperados
- Distribución de ácidos grasos (en hidrólisis con proteasas) o cantidad de ácidos grasos liberados (en hidrólisis con lipasas)

Estos parámetros también fueron medidos en el estudio anterior de “Selección de las enzimas para el tratamiento”.

En la hidrólisis de la fracción proteica del residuo con proteasa, el grado de hidrólisis medido (GH) da idea del porcentaje de proteína transformada en hidrolizados proteicos de lo que también se tiene constancia por el porcentaje de proteína solubilizada de la proteína ya que la hidrólisis de la misma aumenta su solubilidad. El GH, en este caso, no da idea de la transformación de lípidos en ácidos grasos por lo que se determinó el porcentaje de lípidos recuperados y la distribución de ácidos grasos en ellos.

En la hidrólisis de la fracción lipídica del residuo con lipasa, el grado de hidrólisis medido (GH') es indicativo del porcentaje de ácidos grasos liberados respecto al total contenido en los lípidos recuperados de lo que también da constancia la medida de la cantidad de cada ácido graso libre. Sin embargo, en este caso, el GH' no permite conocer si ha habido transformación de proteína en hidrolizados proteicos por lo que se determinó el porcentaje de proteína solubilizada para tener información sobre ello.

El porcentaje de colágeno no hidrolizado se midió para saber la cantidad de este tipo de proteína que se puede recuperar dada su especial aplicación actualmente en el mundo de la cosmética.

El porcentaje de residuo no solubilizado se determinó con la finalidad de conocer la cantidad de residuo que será preciso llevar a vertedero después del tratamiento que es, justamente, lo que se quiere evitar.

Tanto en la hidrólisis de la fracción proteica con proteasas como en la hidrólisis de la fracción lipídica con lipasas se ha optado por utilizar exactamente el mismo esquema de desarrollo en la tesis para un seguimiento más fácil de los estudios realizados.

- **Optimización del tratamiento con las enzimas combinadas:**

Una vez determinadas en el estudio anterior cuáles son las variables más significativas del proceso, se hizo un diseño factorial de experimentos con el fin de minimizar el número de los mismos a realizar al trabajar con una mezcla de proteasa y lipasa añadida al reactor. No se utilizó diseño factorial de experimentos en los estudios anteriores debido al elevado número de parámetros que intervenían en el proceso.

En este estudio se analizó la influencia de las siguientes variables:

- Relación entre concentración inicial de proteasa/concentración inicial de fracción proteica del sustrato
- Relación entre concentración inicial de lipasa/concentración inicial de fracción lipídica del sustrato
- pH

- Temperatura

Los parámetros analizados fueron:

- Porcentaje de residuo no solubilizado
- Porcentaje de proteína solubilizada
- Porcentaje de colágeno no hidrolizado
- Porcentaje de lípidos recuperados
- Cantidad de ácidos grasos liberados

El motivo de analizar estos parámetros fue el indicado anteriormente. En este estudio no se pudo determinar el grado de hidrólisis ya que el método elegido para su determinación (ver Capítulo IV de Materiales y Métodos) no permite diferenciar entre la hidrólisis de proteínas y la hidrólisis de lípidos cuando se utiliza una mezcla de proteasas y lipasas.

- **Obtención de ecuaciones generales de predicción:**

Con la finalidad de hacer un correcto cambio de escala que permita el tratamiento de todos los residuos de carnicería generados en la Comunidad de Castilla y León, se hizo un estudio para obtener ecuaciones a partir de las cuales se pueda pasar del diseño a escala de laboratorio al diseño a escala industrial.

En el estudio se pueden diferenciar tres partes:

- Determinación de la cinética de la hidrólisis de la fracción proteica del residuo de carnicería con proteasa
- Determinación de la cinética de la hidrólisis de la fracción lipídica del residuo de carnicería con lipasa
- Aplicación del método de superficie de respuesta en la hidrólisis simultánea de las fracciones proteica y lipídica del residuo de carnicería con una mezcla de proteasa y lipasa.

En los dos primeros casos, se han determinado ecuaciones de predicción del grado de hidrólisis para las distintas condiciones de operación y, dado que se ha demostrado la relación existente entre el grado de hidrólisis y la obtención de

subproductos, a partir de ese grado de hidrólisis se pueden determinar las cantidades de subproductos obtenidos. En el tercer caso, se han obtenido directamente ecuaciones de predicción de cantidades de subproductos para las diferentes condiciones de operación.

- **Evaluación económica:**

Con la finalidad de determinar si el tratamiento de hidrólisis simultánea de las fracciones proteica y lipídica del residuo de carnicería con una mezcla de proteasa y lipasa sería rentable o no, se realizó una evaluación económica del proceso.

En esa evaluación se determinaron los factores que influyen desde el punto de vista económico en el proceso, calculando:

- Costes de tratamiento
- Ingresos por venta de subproductos obtenidos
- Beneficio económico resultante

Aunque este estudio está planteado para el tratamiento de los residuos de carnicería de la Comunidad de Castilla y León, sería extrapolable a otras Comunidades ya que en todas ellas existe el problema de incumplimiento de la legislación vigente en cuanto a la cantidad de residuos biodegradables cuyo destino es el vertedero.

CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Metodología

La metodología seguida ha consistido en la recogida y pretratamiento del residuo de carnicerías con el objeto de obtener una muestra homogénea y representativa que ha sido dividida en porciones y congelada para su uso posterior.

El residuo fue caracterizado en cuanto a contenido en humedad, cenizas, fibra, lípidos, colágeno, proteínas, distribución de ácidos grasos e índice de saponificación, y utilizado en la hidrólisis enzimática.

Transcurrido el tiempo de hidrólisis fijado se desactivó la enzima por calentamiento a elevada temperatura durante unos minutos y el contenido del reactor se centrifugó y filtró para obtener las tres fases finales: fase sólida, fase acuosa y fase lipídica.

En la fase sólida se determinó el colágeno no hidrolizado, en la fase acuosa la proteína solubilizada y en la fase lipídica el contenido en ácidos grasos. En la figura 4.1 aparece un esquema del proceso seguido.

Todos los experimentos de hidrólisis se llevaron a cabo por duplicado, analizándose las variables a optimizar por triplicado en cada una de las réplicas y calculando el valor medio para los estudios comparativos.

Para la definición del error experimental en las medidas se determinó la desviación estándar y en los casos en los que ésta fuese superior al 10 %, se descartó la medida y se volvió a realizar el ensayo o la hidrólisis dependiendo de dónde estuviera el error.

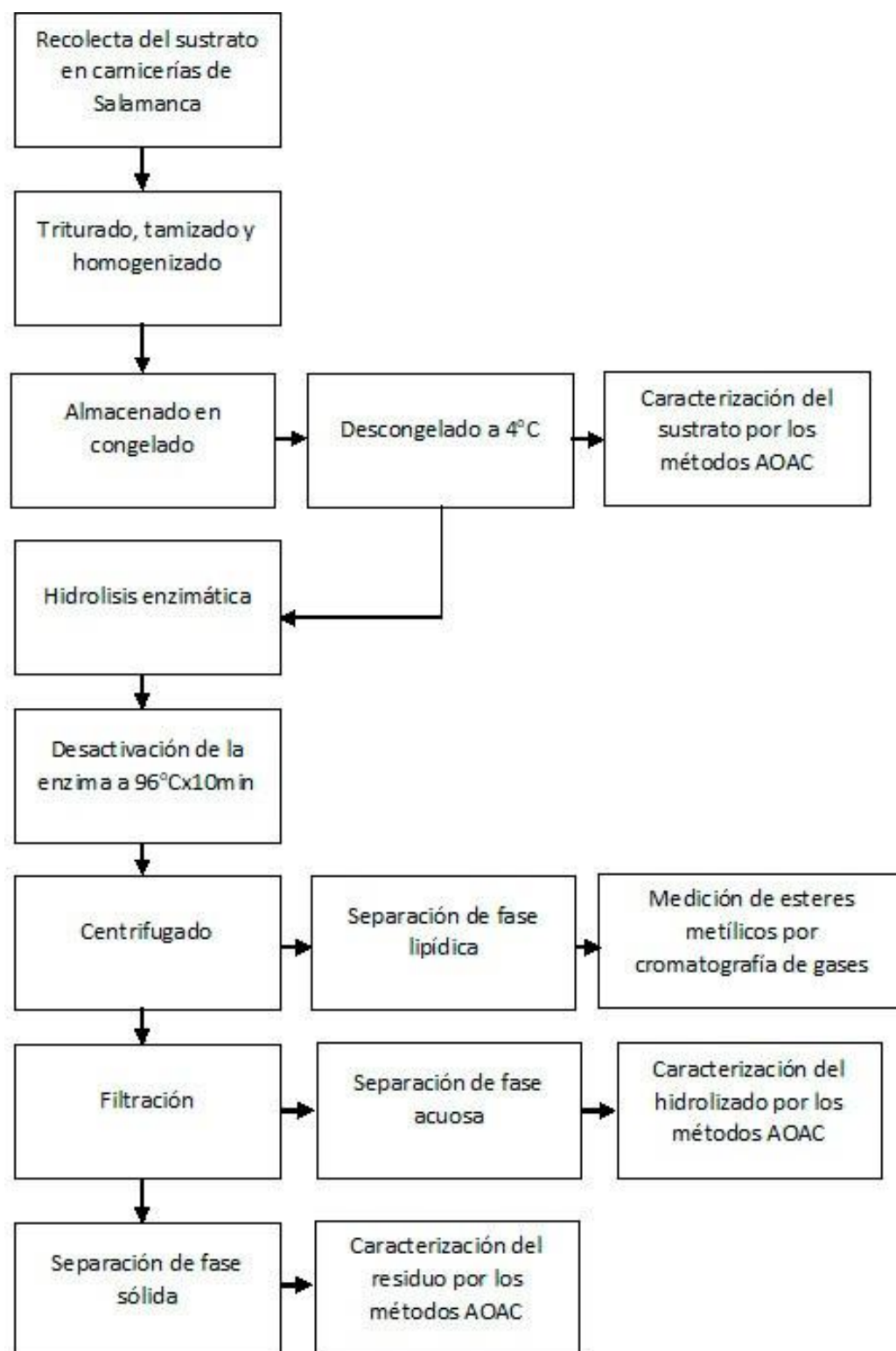


Figura 4.1. Diagrama de flujo del proceso experimental

4.2. Recogida y pretratamiento del sustrato

Principio

Recogida, molienda, tamizado y cuarteo del residuo de carnicería para obtener una muestra homogénea, representativa y más fácilmente atacable por las enzimas.

Aparatos y Materiales

- Bolsas con cierre a presión 25x35 cm
- Molino de cuchillas Restch tipo SM 2000 (especial para residuos)
- Residuos de carnicería
- Tamiz de agujeros trapezoidales de 1 mm de diámetro

Procedimiento

Como la generación de residuos de carnicería no es idéntica todos los días, se recogieron los residuos generados a lo largo de varios días para obtener un valor medio. Los residuos se recogieron en una carnicería que, según estudios previos llevados a cabo por el Grupo de Investigación de Gestión Ambiental y Aprovechamiento de Recursos, tenía un residuo representativo de los residuos de carnicería de la Comunidad de Castilla y León.

El proceso de pretratamiento se puede considerar el procedimiento dividido en dos partes: la mecánica consistente en molienda y tamizado y la física consistente en homogeneización.

➤ **Pretratamiento Mecánico**

Está dirigido a reducir el tamaño de los sustratos favoreciendo una mejor actuación de las enzimas (Martínez y García, 2016).

Las muestras recogidas se molieron con un molino de cuchillas Restch tipo SM 2000 especial para residuos (figura 4. 2).



Figura 4.2. a) Molino Restch tipo SM 2000; b) Cuchillas del Molino SM 2000

La molienda se llevó a cabo hasta que el residuo alcanzó un tamaño tal que le permitió pasar por un tamiz de agujeros trapezoidales de 1mm de diámetro (figura 4.3). El tamiz está ubicado dentro del propio molino por lo que las etapas de molienda y tamizado son simultáneas.

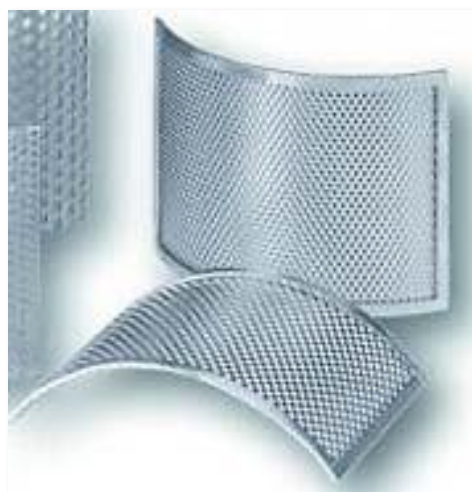


Figura 4.3. Tamiz de base para molinos de corte SM 2000, con agujero trapezoide de 1mm de diámetro

➤ **Pretratamiento Físico**

Está dirigido a obtener una muestra homogénea en el caso de residuos formados por componentes muy diferentes (Martínez y García, 2016).

Para la homogeneización se utilizó el método de cuarteo consistente en dividir la muestra en cuatro partes aproximadamente iguales (A, B, C y D), haciendo una cruz sobre ella. De ellas se eliminan dos partes opuestas (por ejemplo, B y C) y las dos partes restantes (A y D), se homogeneizan de nuevo y dividen en cuatro partes para volver a eliminar dos partes opuestas (figura 4.4). Esta operación se repite hasta dejar, una muestra de unos 10 kg. De este modo se obtiene una muestra representativa (Elizondo y Jiménez, 2016).

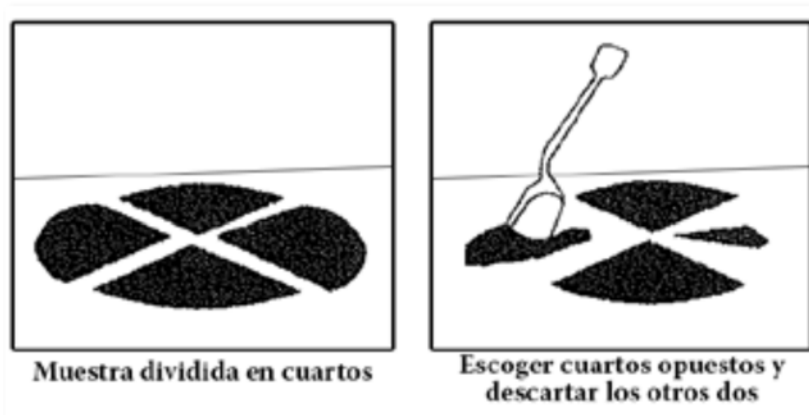


Figura 4.4. Método de cuarteo (Elizondo y Jiménez, 2016).

La muestra así obtenida se dividió en porciones que se congelaron dentro de bolsas de plástico con cierre hermético para su posterior utilización. Antes de su utilización los residuos fueron descongelados dejándolos toda la noche en el frigorífico a una temperatura de 4°C.

4.3. Determinación de Humedad

Principio

Desecación en estufa a 105°C hasta obtener un peso constante (AOAC 2005, método 950.46).

Aparatos y Materiales

- Balanza analítica Precisa XT 220A
- Capsula de porcelana
- Desecadores con placa de metal con cloruro de calcio como deshidratante
- Estufa isotérmica de calefacción eléctrica

Procedimiento

Se pesaron, con precisión de 1 mg, alrededor de 5g de muestra en una cápsula de porcelana previamente tarada. Se introdujo la cápsula con la muestra en una estufa a 105°C hasta peso constante (al menos 16-18 horas). Una vez sacada la muestra de la estufa, se dejó enfriar en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente, después de lo cual se pesó la cápsula con la muestra seca.

El contenido en humedad se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{M-m}{M} \times 100 \quad \text{Ec. 4.1}$$

donde:

M = masa inicial de muestra (g)

m = masa de muestra seca (g)

4.Determinación de Cenizas

Principio

Calcinación a 540°C de la muestra para eliminar la materia orgánica de modo que quede solo la materia inorgánica que constituye las cenizas (AOAC 2005, método 960.39).

Aparatos y Materiales

- Balanza analítica Precisa XT 220A
- Cápsula de porcelana
- Horno mufla
- Placa calefactora

Procedimiento

Se pesaron sobre una cápsula de porcelana previamente calcinada y tarada unos 5 g, con precisión de 1 mg, de la muestra seca obtenida tras recibir el tratamiento para determinar su humedad (punto 4.2. del presente capítulo), colocándose la cápsula sobre la placa calefactora hasta la carbonización de la muestra. Posteriormente, se introdujo la cápsula en una mufla (figura 4.5) programada para alcanzar una temperatura de 540°C, mantenerla durante 2h y permitir el enfriamiento hasta 200°C. Una vez retirada de la mufla la cápsula con las cenizas se dejó enfriar en el desecador y se pesó una vez hubo alcanzado la temperatura ambiente.



Figura 4.5. Horno Mufla.

El contenido en cenizas de la muestra se determinó de acuerdo con la expresión que aparece a continuación:

$$Cenizas (\%) = \left(\frac{m_{cen} - m_{cap}}{m} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 4.2}$$

donde:

m_{cap} = masa de capsula vacía (g)

m_{cen} = masa de capsula con cenizas (g)

m = masa de muestra seca (g)

5. Determinación de Fibra Bruta

Principio

La fibra bruta es el residuo orgánico lavado y seco que queda después de tratar a la muestra con soluciones en ebullición de ácido sulfúrico e hidróxido de potasio de concentraciones determinadas (AOAC 2005, método 950.02 adaptado al equipo utilizado).

Aparatos y Materiales

- Balanza analítica Precisa XT 220A
- Crisoles filtrantes de vidrio
- Equipo Tecator Fibertec 1020 System M6
- Estufa isotérmica de calefacción eléctrica
- Horno mufla
- Trompa de agua para vacío

Reactivos

- Ácido sulfúrico 0,13 M
- Hidróxido potásico 0,23 M
- 1-Octanol 99% para síntesis

- Acetona para análisis
- Agua destilada

Procedimiento

Para la determinación de fibra bruta se utilizó un equipo Tecator Fibertec 1020 System M6 (figura 4.6). Dicho equipo consta de cuatro funciones: CLOSED, VACCUM, PRESSURE y REST (figura 4.7).



Figura 4.6. Equipo Fibertec 1020 System M6



Figura 4.7. Funciones del equipo Fibertec 1020 System M6

Se pesaron en un crisol previamente tarado, con una precisión de 1 mg, 1 g de muestra y 1 g de tierra silíceo como coadyudante de filtración. Se introdujo el crisol en la unidad de extracción (en la unidad utilizada caben seis crisoles simultáneamente) y se situaron las válvulas en la posición de CLOSED (las válvulas están situadas en la banda azul del equipo cuya foto aparece en la figura 4.7. Se añadieron 150 ml de H₂SO₄ 0,13 M hirviendo y unas gotas de agente antiespumante (n-octanol), llevando la mezcla a ebullición y manteniéndola así durante 30 minutos.

Transcurrido ese tiempo, se posicionaron las válvulas en la posición de VACUUM con el fin de filtrar a vacío la muestra tratada con el ácido. El residuo obtenido tras la filtración a vacío se lavó tres veces con 50 ml de agua destilada hirviendo y se secó por aspiración (posición de las válvulas: PRESSURE).

A continuación, se colocaron de nuevo las válvulas en posición CLOSED y se repitió exactamente el mismo proceso, pero sustituyendo el H₂SO₄ 0,13 M por 150 ml de KOH 0,23 M. Una vez seco el residuo, se lavó de nuevo tres veces más pero, en este caso, con 30 ml de acetona. Finalizados estos lavados se pusieron las válvulas del equipo de extracción en posición REST.

Transcurrida una hora para que se secase el residuo lavado, se retiró el crisol y se introdujo en una estufa a 105°C hasta peso constante. Posteriormente, se llevó a una mufla a 475°C en cuyo interior se mantuvo durante 2 horas, tras lo cual se dejó enfriar en el desecador y se pesó en balanza analítica.

El contenido en fibra bruta se calculó por la expresión:

$$Fibra Bruta (\%) = \frac{\Delta m_1 - \Delta m_2}{m} \times 100 \quad Ec. 4.3$$

dónde:

m = Masa de la muestra seca (g)

Δm_1 = Pérdida de masa por calcinación a 475°C del residuo de la muestra después de secar a 105°C (g)

Δm_2 = Pérdida de masa por calcinación a 475°C del residuo del blanco después de secar a 105°C (g)

6. Determinación de lípidos (grasa bruta)

Principio

Se considera grasa al extracto etéreo que se obtiene cuando la muestra es sometida a extracción con éter de petróleo (AOAC 2005, método 960.39).

Aparatos y Materiales

- Algodón desengrasado
- Anillos de Raschig de porcelana
- Balanza analítica Precisa XT 220A
- Cartuchos de extracción de celulosa
- Equipo Tecator Soxtec® 1043 System HT-6
- Estufa isotérmica de calefacción eléctrica

Reactivos

- Éter de Petróleo 40-60°C para análisis

Procedimiento

En el proceso se ha utilizado un equipo de extracción Soxhlet: Tecator Soxtec® 1043 System HT-6 (figura 4.8). Dicho equipo consta de dos funciones: BOILING y RINSING (figura 4.9).

Se introdujeron 3 g de muestra a analizar, pesados con una precisión de 1 mg, en el cartucho de extracción de celulosa y se cubrió con un tapón de algodón desengrasado. Este cartucho se puso dentro del recipiente donde se recoge el extracto, previamente tarado, con unos 50 ml de éter y un par de anillos Raschig, introduciéndolo en el equipo de extracción (el equipo tiene capacidad para trabajar con seis recipientes simultáneamente). Se conectó la refrigeración con un flujo de agua fría de 2 l/min para prevenir la evaporación del disolvente en los condensadores.

La extracción se llevó a cabo en dos etapas. En la primera de ellas (posición BOILING del extractor), los cartuchos permanecieron sumergidos en éter en ebullición a una temperatura de 110°C durante 30 minutos, con el fin de extraer la mayor parte del material soluble. En la segunda etapa, los cartuchos se tuvieron 30 minutos en posición

RINSING, para permitir un lavado eficiente de la muestra con el disolvente procedente de los condensadores.

Posteriormente se procedió a la evaporación del éter. Una vez evaporado el disolvente, se retiraron los recipientes de extracción y se llevaron a una estufa a 105°C donde se mantuvieron pesando cada media hora aproximadamente ya que, al principio disminuye el peso debido a la eliminación de posibles restos de éter, pero llega un momento que aumenta su peso por la oxidación de los ácidos grasos. El peso mínimo es el que se ha de considerar en los cálculos.

El disolvente evaporado se recogió para su reutilización.



Figura 4.8. Equipo de extracción Soxhlet

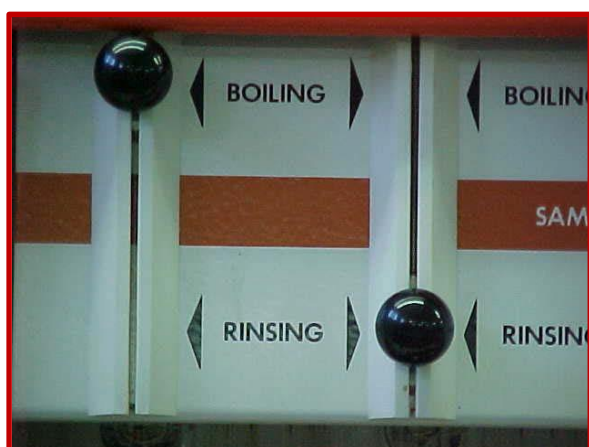


Figura 4.9. Funciones del equipo de extracción Soxhlet

El contenido en grasa viene dado por la siguiente ecuación:

$$\text{Lípidos (\%)} = \frac{m_{rec+lip} - m_{rec}}{m} \times 100 \quad \text{Ec. 4.4}$$

dónde:

$m_{rec+lip}$ = Masa del recipiente de extracción + masa de lípidos (g)

m_{rec} = Masa del recipiente de extracción (g)

m = Masa de la muestra seca (g)

7. Determinación del índice de saponificación

Principio

El índice de saponificación es una medida relacionada con el peso molecular o tamaño medio de las cadenas de los ácidos grasos constituyentes de un aceite o grasa. Se cuantifica como el número de miligramos de hidróxido de potasio necesarios para saponificar un gramo de sustancia grasa (AOAC 2005, método 920.160).

Existe una relación inversamente proporcional entre el índice de saponificación y el peso molecular de un lípido: los lípidos constituidos por ácidos grasos de cadena larga tienen valores bajos de índice de saponificación porque tienen un número relativamente menor de grupos funcionales carboxílicos por unidad de masa de lípido y, por ello, el peso molecular es alto (Hernández, 2017).

Aparatos y Materiales

- Agitador magnético con placa calefactora
- Balanza analítica Precisa XT 220A
- Bureta de 50 ml
- Matraz esférico de vidrio de 200 ml inatacable por álcalis y con cuello esmerilado
- Pipeta de 25 ml
- Refrigerante de reflujo con salida adaptable al matraz esférico

Reactivos

- Ácido clorhídrico 0,5 M
- Fenolftaleína al 1% en etanol
- Hidróxido potásico, solución etanólica, 0,5 M

Procedimiento

Se pesaron 2 g de muestra, con una precisión de 1 mg, en el matraz agregando 25 ml de solución etanólica de KOH 0,5 M y un seguidor magnético. Se colocó el refrigerante de reflujo al matraz y se puso este sobre una placa calefactora (figura 4.10) manteniendo la mezcla en ebullición durante 60 minutos y agitando constantemente. Se separó el matraz de la fuente de calor, se agregaron unas gotas de fenolftaleína, y se valoró la disolución caliente con ácido clorhídrico 0,5 M.

Se realizó un ensayo en blanco siguiendo exactamente los mismos pasos, pero sin añadir muestra.

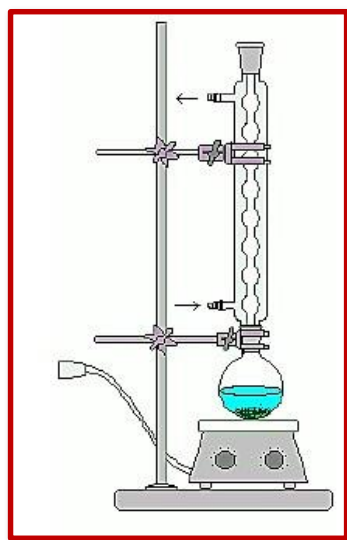


Figura 4.10. Equipo de reacción a reflujo

El índice de saponificación se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de saponificación (mg KOH/g)} = \left(\frac{56,1 \times M_{HCl} \times (V_{HCl} - V'_{HCl})}{m} \right) \quad \text{Ec. 4.5}$$

donde:

M_{HCl} = Concentración exacta de la solución de ácido clorhídrico utilizado (M)

V_{HCl} = Volumen de solución de HCl 0,5 M utilizado en la prueba en blanco (ml)

V'_{HCl} = Volumen de solución de HCl 0,5 M utilizado en el ensayo (ml)

m = Masa de muestra seca (g)

8. Determinación del colágeno total

Principio

El método está basado en la determinación colorimétrica de la hidroxiprolina, que es un aminoácido característico del colágeno, que no está presente en ninguna otra proteína animal.

Para ello se hidrolizan las proteínas del residuo cárnico en medio ácido con el fin de que se libere la hidroxiprolina que se oxida con cloramina T, formándose (tras la adición de p-dimetilaminobenzaldehído) un derivado coloreado que se cuantifica colorimétricamente en un espectrofotómetro. Se ha seguido la metodología de la AOAC (AOAC 2005, método 990.26), con algunas modificaciones descritas posteriormente.

Aparatos y Materiales

- Balanza analítica Precisa XT 220A
- Baños termostáticos
- Cubetas de poliestireno desechables para espectrofotómetro con longitud de trayectoria óptica de 10 mm
- Erlenmeyers de 200 ml
- Espectrofotómetro de doble haz Hitachi U-2000
- Filtros de acetato de 0.45 micras para jeringas
- Jeringas para filtración
- Matraces aforados de 10, 100, 200 y 250 ml
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5, 10 y 25 ml
- Tubos de ensayo con enrase a 12 ml y tapón

Reactivos

- Ácido perclórico al 17,5%
- Ácido sulfúrico 7N
- Agua destilada
- Cloramina T al 10,5 %
- Hidróxido sódico al 10%
- L- Hidroxiprolina pura
- p-Dimetilaminobenzaldehido al 5% en 2-propanol
- 2-Propanol grado técnico
- Solución oxidante (contiene un volumen de solución de cloramina T al 10,5% y 4 volúmenes de solución tampón pH 6; debe prepararse en el momento de usarse)
- Solución tampón pH 6 (obtenida disolviendo 34 g de acetato sódico anhidro, 36,5g de citrato sódico monohidratado y 5,5g de ácido cítrico anhidro en 385 ml de 2-propanol puro y enrasando con agua destilada hasta 1000 ml)

Procedimiento

Se pesaron 5 g de muestra, con precisión de 1 mg, en un Erlenmeyer, añadiendo 30 ml de ácido sulfúrico 7 N, tapando el Erlenmeyer y dejándolo durante 24 horas en la estufa a 105°C. Transcurrido ese tiempo, se sacó el Erlenmeyer de la estufa transvasando su contenido a un matraz aforado de 200 ml y se enrasando con agua destilada. Se filtró la disolución para retener posibles partículas que pudieran interferir en la colorimetría. Se tomaron 25 ml del filtrado, ajustándose el pH entre 6,5-7,0 con una solución de hidróxido sódico al 10 %, transvasándose posteriormente a matraces aforados de 100 ml.

Para el calibrado se hizo una curva patrón. Para ello se preparó una solución madre con 100 µg/ml de L- Hidroxiprolina, a partir de la cual se obtuvieron soluciones patrón con 3, 5, 8 y 10 µg/ml de ese compuesto.

A continuación, se preparó una serie de tubos de ensayo con enrase a 12 ml, y se añadió 1 ml de agua destilada en uno de los tubos (tubo blanco), en los siguientes 1 ml de las soluciones que contienen 3, 5, 8 y 10 µg/ml (patrones), y en los restantes 1 ml de cada una de las disoluciones de las muestras problema.

En cada uno de los tubos se añadieron 2 ml de 2-propanol y 1 ml de solución oxidante, se agitó la mezcla y se dejó reposar 10 minutos.

Posteriormente se añadieron a cada tubo 3 ml de ácido perclórico al 17,5% para detener la oxidación y 2 ml de p-dimetilaminobenzaldehído al 5% en 2-propanol; se homogeneizó la mezcla y se introdujeron los tubos en un baño maría a una temperatura de 60°C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se dejaron enfriar en un baño de agua fría, se enrasaron a 12 ml con 2-propanol y se procedió a realizar la lectura de las absorbancias en un espectrofotómetro (figura 4.11) a una longitud de onda de 560 nm.



Figura 4.11. Espectrofotómetro de doble haz. Hitachi U-2000

En la figura 4.12 se incluye, como ejemplo, una de las rectas de calibrado obtenidas.

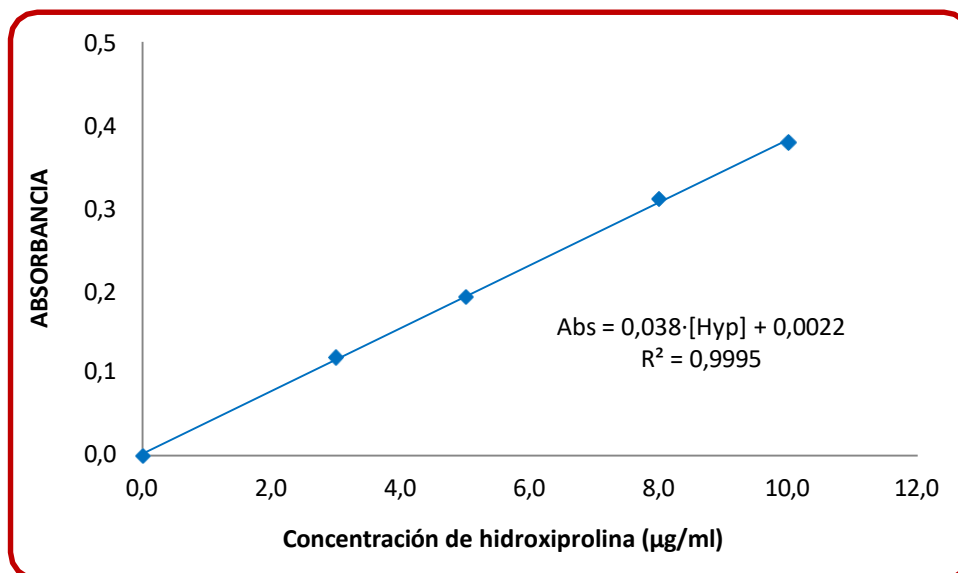


Figura 4.12. Recta de calibrado para la determinación de colágeno

La concentración de L-hidroxiprolina en la muestra se obtuvo a la partir del ajuste de la recta de calibrado según la siguiente ecuación:

$$[Hyp] = \frac{(Abs-B)}{A} \quad \text{Ec. 4.6}$$

donde:

$[Hyp]$ = Concentración de hidroxiprolina ($\mu\text{g/ml}$)

Abs = Absorbancia

B = Ordenada en el origen de la recta de calibrado

A = Pendiente de la recta de calibrado

La concentración de hidroxiprolina por gramo de muestra se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$Hyp = \frac{[Hyp]*0,8}{m} \quad \text{Ec. 4.7}$$

y la de colágeno multiplicando ese valor por ocho:

$$\text{Colágeno (mg/g)} = Hyp \cdot 8 \quad \text{Ec. 4.8}$$

siendo:

Hyp = Contenido en hidroxiprolina (mg/g)

$[Hyp]$ = Contenido en hidroxiprolina (mg/l)

m = Masa de la muestra seca (g)

4.9. Determinación de Proteína bruta - Método Kjeldahl

Principio

Dado que la estructura básica de las proteínas son los aminoácidos Individuales y en ellos el contenido en nitrógeno varía sólo entre unos límites muy estrechos (15 al 18%;

en promedio 16%), su determinación analítica se puede hacer a partir del contenido en nitrógeno, transformando dicho contenido en nitrógeno en contenido en proteína mediante un factor de 6,25 (AOAC 2005, método 981.10 adaptado al equipo utilizado).

La determinación del nitrógeno se lleva a cabo mediante el ataque de la muestra a analizar por ácido sulfúrico en presencia de un catalizador. En ese proceso de digestión, el nitrógeno orgánico se transforma en iones amonio que, en medio fuertemente básico, y mediante destilación por arrastre de vapor, se transforman en amoniaco, que es recogido sobre un exceso de ácido. Una posterior valoración permite el cálculo de la cantidad inicialmente presente de nitrógeno en la muestra.

Aparatos y Materiales

- Anillos de Rasching de porcelana
- Aparato de destilación 2100 Kjeltex® System.
- Balanza analítica Precisa XT 220A
- Bureta de 50 ml
- Equipo de digestión para proteínas Block-Digest
- Matraces Erlenmeyer de 200 ml
- Pipetas de 10, 25 y 50 ml.
- Probeta de 100 ml
- Trompa de vacío
- Soporte de abrazadera
- Vaso precipitado de 500ml
- Vidrio de reloj con borde esmerilado de 100 mm de diámetro

Reactivos

- Ácido bórico al 4 %
- Ácido clorhídrico 0,2 N
- Ácido Sulfúrico al 98%
- Agua destilada
- Catalizador Kjeldahl
- Disoluciones de hidróxido sódico al 40 % y 0,25 M.

- Indicador mixto rojo de metilo-azul de metileno (0,04 g de Rojo de metilo y 0,02 g de azul de metileno en 20 ml de etanol al 96 %)

Procedimiento

Como se ha indicado anteriormente, el método Kjeldahl consta de tres etapas: digestión, destilación y valoración.

1) Digestión

Se pesaron 5 g de muestra con una precisión de 0,001 g y se introdujeron en un tubo de digestión, añadiendo una tableta de catalizador Kjeldhal, 25 ml de ácido sulfúrico concentrado y unos anillos Raschig. Se homogeneizó bien la mezcla procurando que todo el material quedara sumergido en el sulfúrico para evitar las pérdidas de nitrógeno.

Se colocó el tubo en el equipo de digestión (figura 4.13.) y éste se ubicó dentro de una vitrina con extracción de humos. Para llevar a cabo la digestión, se fijó en la unidad de control, un programa con una temperatura de 400°C y un tiempo de 2 horas manteniendo conectado el equipo a la trompa de vacío durante todo el proceso. Durante el proceso, la mezcla pasa de ser una disolución de color marrón- negro, a una disolución cristalina de color turquesa.



Figura 4.13. Equipo de digestión para proteínas Block-Digest

2) Destilación

Finalizada la digestión, se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente durante 2h, añadiendo con precaución unos 75 ml de agua destilada en el tubo de digestión para disolver completamente los sulfatos y llevando el tubo de Kjeldahl al equipo de destilación 2100 Kjeltec® System (figura 4.14).

En el otro extremo del aparato de destilación se situó un Erlenmeyer con 50 ml de ácido bórico al 4 % y unas gotas de indicador rojo de metilo procurando que el terminal del equipo de destilación quede inmerso en la disolución al menos 1 cm para evitar fugas de amoniaco. Se añadieron 110 ml de NaOH al 40 % al tubo de digestión y se mantuvo la destilación hasta recoger, como mínimo, unos 125 ml. La disolución de ácido bórico que originalmente tenía color fucsia pasa a verde con el tiempo.



Figura 4.14. Equipo de destilación por arrastre de vapor 2100 Kjeltec® System

3) Valoración

Una vez finalizada la destilación se retiró el Erlenmeyer del equipo de destilación, se añadieron unas gotas más de indicador mixto y se valoró el contenido con HCl 0,2 N hasta que la disolución viró de verde a violeta.

Con la finalidad de comprobar si los reactivos contenían nitrógeno, se realizó una prueba en blanco siguiendo exactamente el mismo procedimiento (digestión, destilación y valoración) pero en la que se sustituyeron los 5 g de muestra por 5 ml de agua.

El contenido en nitrógeno se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$N (\%) = \left(\frac{V_1 - V_0}{m} \times 0,014 \times N_{HCl} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 4.9}$$

donde:

V_0 = HCl consumido en la valoración del blanco (ml)

V_1 = HCl consumido en la valoración de la muestra (ml)

M = masa de la muestra seca (g)

N_{HCl} = Normalidad del HCl

Determinando posteriormente el porcentaje de proteína bruta del siguiente modo:

$$Proteina Bruta (\%) = N (\%) \times 6,25 \quad \text{Ec. 4.10}$$

4.10. Determinación de Ácidos Grasos

Principio

El método utilizado está basado en la metilación de los ácidos grasos contenidos en los lípidos y el posterior análisis cromatográfico de los ésteres metílicos formados (AOAC 2002, método 996.06).

Aparatos y Materiales

- Balanza analítica Precisa XT 220^a
- Columna capilar de polietilenglicol (modelo BP20 de SGE Analytical Science)

- Cromatógrafo de gases Agilent modelo 6890
- Micropipetas de 100-500 μl
- Puntas micropipetas pipeta estériles 10-1000 μl
- Tubos Eppendorf 2 ml
- Microjeringa Hamilton de 1 μl

Reactivos

- Aire de alta pureza $\geq 99,999\%$
- Ésteres metílicos de ácidos grasos de referencia F.A.M.E. Mix C4-C24 de SUPELCO
- Hidrógeno de alta pureza $\geq 99,999\%$
- Metil t-butil éter del 99,0%
- Nitrógeno de alta pureza $\geq 99,999\%$
- Solución metanólica de hidróxido de trimetilsulfonio 0,2 M

Procedimiento

El proceso consta de dos etapas: la preparación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos y el análisis cromatográfico.

1) *Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos*

Se pesaron 10 mg \pm 2 mg de muestra de la fase lipídica en un tubo Eppendorf. Posteriormente, en el mismo tubo, se añadieron 500 μl de metil t-butil éter de pureza 99,0% disolviendo la muestra. A continuación, se adicionaron 250 μl de una solución metanólica de 0,2 mol/l de hidróxido de trimetilsulfonio, agitando energicamente durante aproximadamente 30 segundos.

La solución así obtenida pasará posteriormente a ser inyectada en el cromatógrafo de gases. Como los ésteres metílicos de ácidos grasos libres sólo se forman durante la inyección, se requiere que la temperatura del inyector sea, por lo menos, 250°C.

2) Determinación de los ésteres metílicos de ácidos grasos

El análisis de los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME) se ha realizado por cromatografía gaseosa utilizando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N (figura 4.15), con un software denominado ChemStation diseñado para ordenadores personales compatibles con IBM con un sistema operativo Microsoft® Windows XP Professional. Este software está fundamentado en un modelo de datos basado en una estructura de memoria denominada registro, que permite configurar los instrumentos para cromatografía y de esta forma llevar a cabo los análisis. El equipo está conectado a un ordenador Scenic, con Microsoft® Windows XP Professional como sistema operativo, que permite la adquisición y posterior tratamiento de los datos obtenidos.



Figura 4.15. Cromatógrafo de gases Agilent Technologies

La columna utilizada para estos análisis fue una columna capilar de polietilenglicol (modelo BP20 de SGE Analytical Science), fase polar, con dimensiones 30m x 0,25mm x 0,25 μ m (figura 4.16).

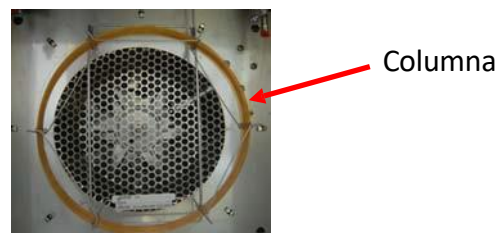


Figura 4.16. Columna Capilar BP20

Las condiciones para llevar a cabo el análisis en el cromatógrafo de gases incluyeron una programación de temperatura en el horno con dos rampas: inicialmente la temperatura se fijó en 155°C manteniéndose 1 minuto, subiéndola con una velocidad de 2°C/min hasta 180°C donde se mantuvo durante 2 min, y elevándola nuevamente con una velocidad de 4°C/min hasta 220°C donde se mantuvo 5 minutos, de modo que el tiempo total del ensayo fue de 30,50 minutos (tabla 4.1).

Tabla 4.1. Programación del análisis por cromatografía de gases

	Velocidad de calentamiento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Duración (min)
Inicial		155	1,00	1,00
Rampa 1	2,00	180	2,00	15,50
Rampa 2	4,00	220	5,00	30,50

Como se indicó anteriormente, para el análisis de los ésteres metílicos el inyector debe estar a una temperatura de 250°C.

El detector utilizado para estos análisis fue un detector de ionización de llama (FID) que se mantuvo a una temperatura de 260°C, utilizando hidrógeno (40 ml/min) y aire (450 ml/min) para generar la llama.

El gas portador utilizado fue nitrógeno, con un flujo constante de 1,40 ml/min, equivalente a una velocidad promedio de 38,00 cm/s y una presión aproximada de 21,16 psi.

Para determinar los distintos FAME, se inyectó en el inyector del cromatógrafo 1 µl de la disolución a analizar medido con una microjeringa Hamilton (figura 4.17).



Figura 4.17. Microjeringa Hamilton

El contenido en un éster dado, i , expresado como porcentaje en masa de ésteres metílicos, se calculó determinando el porcentaje que representa el área del pico correspondiente (A_i) respecto a la suma de las áreas de la totalidad de picos (ΣA), de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$\text{Éster metílico}_i (\%) = \frac{A_i}{\Sigma A} \cdot 100 \quad \text{Ec. 4.11}$$

El porcentaje de un ácido dado en la muestra coincide con el porcentaje de su éster en la misma:

$$\text{Ácido graso}_i (\%) = \text{Éster metílico}_i (\%) = \frac{A_i}{\Sigma A} \cdot 100 \quad \text{Ec. 4.12}$$

Con el fin de determinar la cantidad de cada éster, se realizaron rectas de calibrado para los distintos ésteres utilizando ésteres metílicos de ácidos grasos de referencia (F.A.M.E. Mix C4-C24 suministrado por SUPELCO), los cuales se prepararon a diferentes concentraciones (1, 2, 3, 4 y 5 g/l equivalentes a 1000, 2000, 3000, 4000 y 5000

ng/μl), y se analizaron cromatográficamente utilizando el programa descrito anteriormente para analizar los ésteres metílicos.

Los cromatogramas aportaron las áreas para cada una de las concentraciones de FAME preparadas. Se representaron dichas áreas frente a las distintas concentraciones y se ajustaron por mínimos cuadrados a una línea recta.

En la figura 4.18 se muestra un ejemplo de las rectas de calibrado utilizadas para la determinación de los ésteres metílicos.

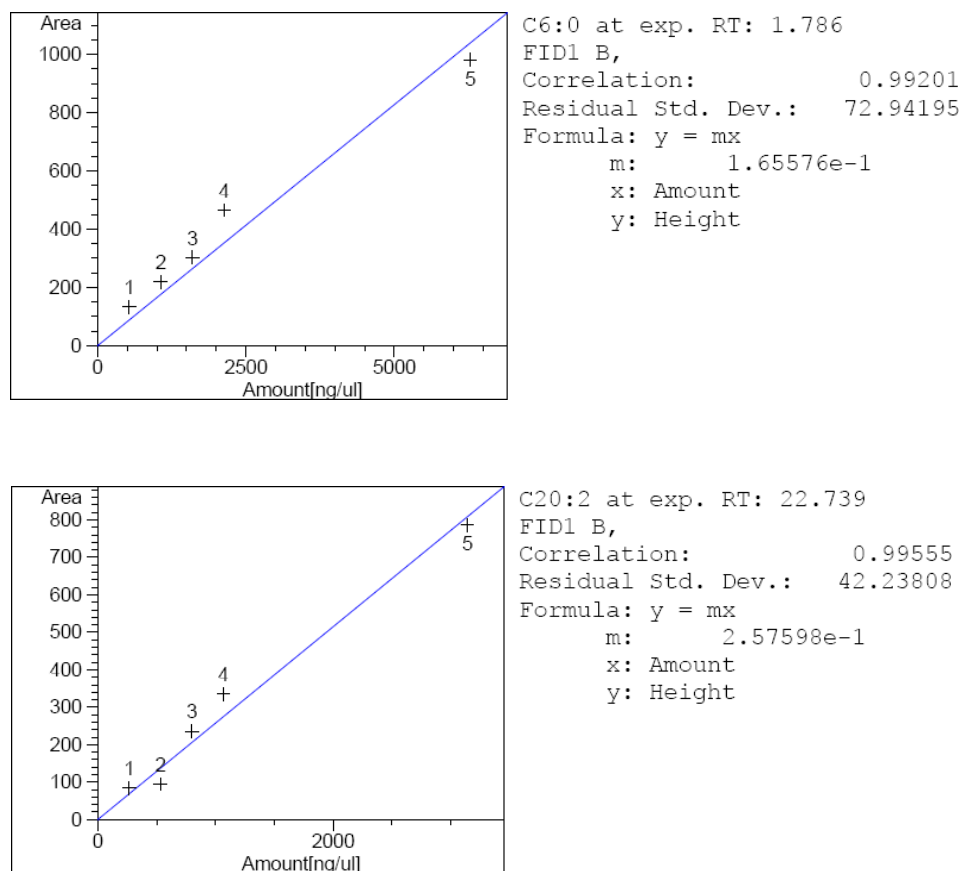


Figura 4.18. Ejemplo rectas de calibrado para determinación de ácidos grasos

Los parámetros de ajuste obtenidos para cada uno de los ésteres metílicos presentes en el FAME, expresada la concentración en ng/μl, se muestran en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Parámetros de ajuste para los ésteres metílicos (concentración en ng/μl)

Ester Metílico	Parámetro Ajuste	r²
C:4	0,1112	0,9754
C:6	0,1656	0,9920
C:8	0,0279	0,9868
C:10	0,1771	0,9902
C:11	0,1787	0,9891
C:12	0,1827	0,9864
C:13	0,1918	0,9910
C:14	0,1977	0,9931
C14:1	0,1986	0,9928
C15:0	0,2076	0,9947
C15:1	0,2078	0,9945
C:16	0,2171	0,9957
C16:1	0,2175	0,9953
C17:0	0,2358	0,9926
C17:1	0,2874	0,9958
C:18	0,2367	0,9952
C18:1n9	0,7380	0,9894
C18:2n6	0,2505	0,9973
C18:3n3	0,4351	0,9835
C18:3n6	0,2517	0,9965
C:20	0,2231	0,9808
C20:1	0,7256	0,9913
C20:2	0,2576	0,9911
C20:3n6+C21:0	0,2557	0,9955
C20:4n6	0,2230	0,9902
C20:3n3	0,2510	0,9967
C20:5n3	0,2491	0,9958
C22:0	0,2444	0,9953
C22:1n9	0,2542	0,9964
C22:2	0,4255	0,9911
C22:6 + C24:1	0,2025	0,9892
C:23	0,2724	0,9935
C:24	0,1352	0,9938

Estas rectas de calibrado permiten calcular la concentración, en ng/μl, de ésteres metílicos contenidos en la muestra.

Para calcular el contenido de cada uno de los ésteres metílicos en la muestra se utilizó la siguiente ecuación:

$$g_{éster_i} / g_{muestra} = \frac{C_{éster_i} 10^{-3} V_d}{g_{muestra}} \quad \text{Ec. 4.13}$$

donde:

$C_{éster_i}$: concentración de éster metílico presente en la muestra (ng/μl).

$g_{éster_i}$: cantidad de éster metílico i en la muestra (g)

$g_{muestra}$: cantidad de muestra presente en la disolución preparada para identificar los ésteres metílicos (g).

V_d : volumen de disolución preparada para identificar los ésteres metílicos (l).

10^{-3} : factor de conversión de ng/μl en g/l.

La cantidad de ácidos grasos correspondiente a esas cantidades de ésteres metílicos se calculó por medio de la relación de pesos moleculares:

$$g_{AG_i} / g_{muestra} = \frac{C_{éster_i} 10^{-3} V}{g_{muestra}} \cdot \frac{PM_{AG_i}}{PM_{éster_i}} \quad \text{Ec. 4.14}$$

donde:

g_{AG_i} : cantidad de ácido graso i presente en muestra (g).

PM_{AG_i} : Peso molecular del ácido graso i (Dalton).

$PM_{éster_i}$: Peso molecular del éster metílico del ácido graso i (Dalton).

4.11. Determinación de la actividad enzimática de proteasas

Para determinar la actividad catalítica de la enzima se mide la cantidad de péptidos generados, después de ser separados del sustrato. Los péptidos solubles en ácido tricloroacético son medidos en el espectrofotómetro mediante el método de Anson (Novo Industrias, 2001).

Aparatos y Materiales

- Balanza analítica Precisa XT 220A
- Baño termostático
- Cubetas de poliestireno desechables para espectrofotómetro con longitud de trayectoria óptica de 10 mm
- Espectrofotómetro de doble haz Hitachi U-2000
- Filtros de acetato de 0.45 micras para jeringas
- Jeringas para filtración
- Matraces aforados de 25 ml
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml
- Tubos de ensayo

Reactivos

- Ácido clorhídrico 1 M
- Ácido tricloroacético 0,3 M
- Agua destilada
- Proteasa
- Hemoglobina
- Hidróxido sódico 0,5 y 1,0 M
- Reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu
- Tampón fosfato (1/15 M, pH=7,5)
- Tripsina
- Urea

Procedimiento

El proceso consta de tres etapas: reacción enzimática, reacción de desarrollo de color y medida de la absorbancia.

1) Reacción enzimática

El sustrato a utilizar en este ensayo fue una solución tamponada de hemoglobina que se preparó suspendiendo 1 g de hemoglobina en unos 20 ml de agua, añadiendo 18 g de urea y 4 ml de la disolución de NaOH 1M. Después de mantenerla a temperatura ambiente durante un periodo de 30 a 60 minutos para permitir la desnaturalización de la enzima, se adicionaron 5 ml de disolución tampón fosfato (1/15 M, pH=7,5), se ajustó a pH 7.5 con una disolución de HCl 1M y se llevó hasta 50 ml con agua destilada hervida.

Para la reacción enzimática, se cogieron tres tubos de ensayo y se adicionó en cada uno de ellos 2 ml de la disolución sustrato. Se dejó que alcanzara la temperatura de incubación de 25°C para después añadirle, a tiempo cero, 1 ml de la enzima cuya actividad se quería determinar. Se mezcló y se dejó incubar durante exactamente 10 minutos. Transcurrido dicho tiempo se adicionaron 5 ml de ácido tricloroacético 0,3 M a cada uno de los tubos. Se mezcló todo y se dejó a 25°C durante 20 minutos. Transcurrido ese tiempo, se filtró el contenido de los tubos de ensayo, eliminando de ese modo la fracción precipitada.

Se realizó un blanco en el que los 2 ml de disolución sustrato, en lugar de añadirse a los tubos de ensayo en primer lugar, se añadieron después de la adición de los 5 ml de ácido tricloroacético 0,3 M, realizándose el resto del proceso de idéntico modo.

2) Reacción de color

Se pipetearon en tubos de ensayo 4 ml de NaOH 0,5 N y se añadieron 2 ml de filtrado y 1,2 ml de reactivo fenólico de Folin-Ciocalteau. Se mezcló y se dejó reaccionar durante 8 minutos.

3) Medida de la absorbancia

Se procedió a la medida de la diferencia de absorbancia entre el blanco y la muestra a 750 nm utilizando la misma cubeta.

La actividad de la enzima analizada viene dada por la siguiente expresión:

$$A_{muestra} = P_{estandar} \cdot \Delta Ab_{muestra} \quad \text{Ec. 4.15}$$

donde:

$A_{muestra}$ = actividad enzimática de la proteasa analizada (UA/l)

$P_{estandar}$ = pendiente de la recta de calibrado realizada con una proteasa de referencia (estándar)

$\Delta Ab_{muestra}$ = diferencia entre las absorbancias medidas de la muestra y el blanco

Con el fin de determinar la actividad de la muestra, se realizó una línea de calibrado utilizando una proteasa de referencia de actividad Anson conocida, usualmente tripsina pancreática, que se sometió al mismo ensayo que la proteasa problema.

Para este ensayo se empleó tripsina con una actividad de 0,08 UA/g preparándose una disolución de partida mezclando 0,6250 g de tripsina con 2,5 ml de tampón fosfato 1/15 M pH 7,5, y enrasando a 25 ml con agua destilada (las muestras deben ir en un medio con un 10 % de tampón fosfato). De la disolución de partida se tomaron distintos volúmenes (0,6; 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 ml) que se mezclaron a su vez con 2,5 ml de tampón fosfato y se enrasaron a 25 ml con agua destilada para dar las disoluciones con diferentes actividades a utilizar en la realización de la recta de calibrado.

En la figura 4.19 se incluye la recta de calibrado obtenida.

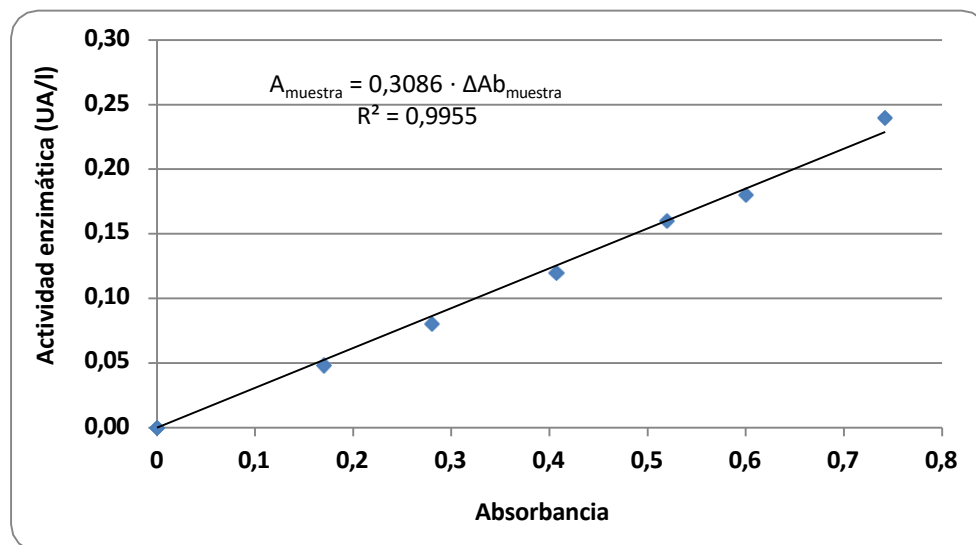


Figura 4.19.- Recta de calibrado para determinación de la actividad enzimática de las proteasas

4.12. Determinación de la actividad enzimática de lipasas

Principio

La actividad enzimática de las lipasas se basa en la hidrólisis de sustratos naturales (triacilglicérol) para dar ácidos grasos. A intervalos de tiempo determinados, se toman muestras de la mezcla de reacción parando ésta por adición de etanol. La cantidad de ácidos grasos liberados durante la reacción se determina por valoración directa con NaOH utilizando timolftaleína como indicador (Pinsirodom y Parkin, 2001).

Aparatos y Materiales

- Agitador magnético
- Baño termostático

- Erlenmeyer de 50 ml con tapón
- Matraces aforados de 200 ml
- Seguidor magnético

Reactivos

- Aceite de oliva
- Agua destilada
- Etanol al 95 %
- Goma arábica
- Hidróxido sódico 0,05 N
- Lipasa
- Tampón de fosfato de sodio 50 mM pH 8.0
- Timolftaleína

Procedimiento

El procedimiento consta de dos etapas: reacción enzimática y valoración.

1) Reacción enzimática

El sustrato a utilizar será una emulsión de aceite de oliva y goma arábica que se prepara mezclando 10 g de aceite de oliva y 10 g de goma arábica con tampón de fosfato de sodio 50 mM pH 8.0 hasta enrasar a 200 ml. Se homogeneiza durante 5 minutos por agitación suave para que no se formen espumas.

En un Erlenmeyer de 50 ml con tapón se ponen 50 ml del sustrato de aceite de oliva/goma arábica al 5 % y se preincuba a 37°C durante 15 minutos en baño con agua y agitación magnética. Se añade una cantidad adecuada de enzima para comenzar la lipólisis del sustrato, se pone en marcha el cronómetro y se continúa agitando.

2) Valoración

A intervalos de 5 minutos (hasta los 30 min) se toman 5 ml de la mezcla de reacción y se llevan a un Erlenmeyer que contiene 10 ml de etanol al 95 % (v/v) y 2 o 3 gotas indicador de timolftaleína. Se agita inmediatamente la mezcla para parar la reacción.

Se valora el contenido de cada Erlenmeyer con NaOH 0,05 N usando una bureta hasta que aparezca un ligero color azul.

Se hará también un blanco mezclando bien, en un Erlenmeyer de 25 ml, 10 ml de etanol al 95 % (v/v), 2 o 3 gotas indicador de timolftaleína y 5 ml de sustrato. El contenido de este Erlenmeyer se valorará también con NaOH 0,05 N.

La cantidad de ácidos grasos liberados en cada muestra de 5 ml tomada de la mezcla de reacción se determina a partir de los equivalentes de NaOH utilizados para alcanzar el punto final de la valoración de acuerdo con la ecuación siguiente:

$$\mu\text{mol ácidos grasos/ml muestra} = [(V_{\text{NaOH}} - V'_{\text{NaOH}}) \cdot N_{\text{NaOH}} \cdot 1000] / 5 \text{ ml}$$

donde:

N_{NaOH} = Concentración exacta de la solución de NaOH utilizado (0,05 N en este caso)

V_{NaOH} = volumen de solución de NaOH 0,05 N utilizado en el ensayo (ml)

V'_{NaOH} = volumen de solución de NaOH 0,05 N utilizado en la prueba en blanco (ml)

Con esos resultados, se hace una curva de progreso de la reacción representando la cantidad de ácidos grasos liberados frente al tiempo de reacción (figura 4.20) y se determina la actividad (velocidad inicial de reacción, v_o) de la lipasa a partir de la pendiente de la zona lineal usando la siguiente ecuación:

$$v_o = \text{Pendiente} = (y_2 - y_1) / (x_2 - x_1) \quad \text{Ec. 4.16}$$

donde las unidades son $\mu\text{mol}/(\text{ml} \cdot \text{min})$, equivalentes a mM/min .

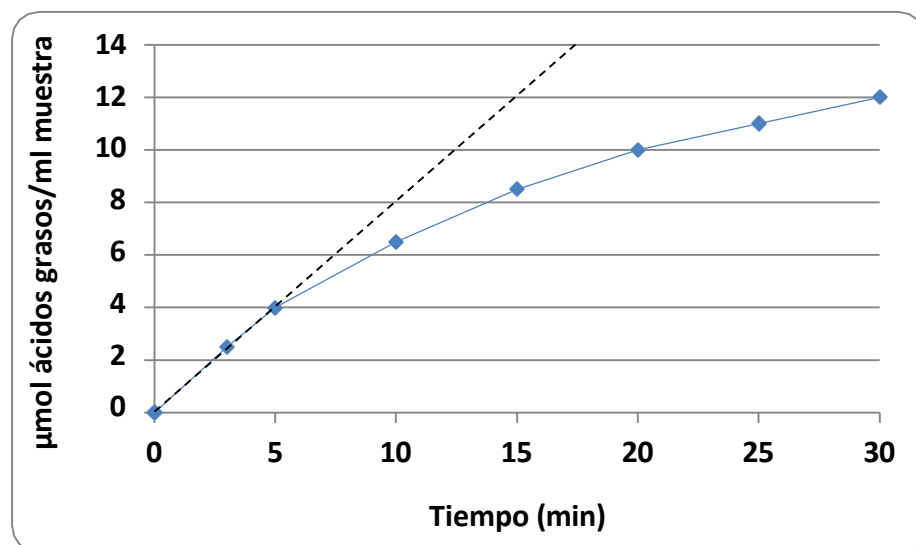


Figura 4.20.- Ejemplo de curva de progreso de la reacción para una lipasa de páncreas porcino

La línea intermitente de la figura 4.20 representa la estimación de la velocidad inicial de reacción.

4.13. Hidrólisis enzimática

Principio

Para el seguimiento de la hidrólisis enzimática se utilizó el método del pH-estado basado en mantener constante el pH del medio de reacción por la adición de base, para neutralizar los protones que son liberados en la reacción de hidrólisis con proteasas (Guadix et al., 2000) o los ácidos grasos liberados en la la reacción de hidrólisis con lipasas (Avelar *et al.*, 2013).

Instalación experimental

Para realizar las hidrólisis enzimáticas se montó una instalación constituida por los siguientes equipos (Figura 4.21):

- Reactor de vidrio encamisado de 500 ml de capacidad provisto de una tapa separable con cinco bocas esmeriladas por las que se introduce el termómetro, el electrodo de pH y una bureta.
- Baño termostataado desde el que se bombea agua a través de la camisa del reactor a la temperatura deseada.
- Electrodo de pH. Se trata de un electrodo de pH 52-02 de Crison cuyo sistema de referencia es Ag/AgCl.
- Agitador magnético con el que se consigue una mezcla completa en el reactor.



Figura 4.21. Dispositivo experimental para la hidrólisis enzimática

Reactivos

- Agua destilada
- Alcalase 2.4L
- Flavourzyme
- Hidróxido sódico 0,2 o 2,5 M
- Lipozyme CALB L
- Lipozyme TL 100L
- Neutralse
- Novocor AD L
- Novozym 51032
- Protamex
- PTN
- Resinase HT

Procedimiento

El procedimiento a seguir en los experimentos de hidrólisis con enzimas se describe a continuación:

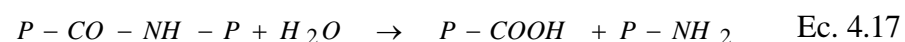
- Se introdujo en el reactor la cantidad de residuo triturado y agua necesaria para conseguir una determinada concentración de sustrato inicial. Asimismo, se introdujeron el termómetro y el electrodo de vidrio para el seguimiento del pH.
- Se permitió que se alcanzara la temperatura y el pH adecuados. Para conseguir el pH fue preciso añadir una base (NaOH).
- Se añadió la cantidad de enzima necesaria para comenzar la reacción.
- La reacción se mantuvo durante el tiempo fijado. Cuando el pH bajaba una décima por debajo del valor deseado se adicionó la cantidad de base necesaria (NaOH) para alcanzar de nuevo dicho valor.
 - Se finalizó la reacción mediante la desactivación de la enzima.

Las enzimas elegidas para el proceso fueron de dos tipos: proteasas y lipasas para catalizar hidrólisis tanto de la parte proteica y como de la parte lipídica del residuo por lo que el seguimiento del proceso estuvo basado en la estructura de dichas partes.

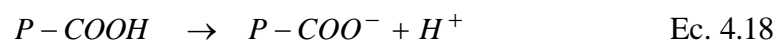
1) *Hidrólisis de proteínas*

Para seguir el proceso de hidrólisis de proteínas se utilizó el consumo de base en función del tiempo. Con este método se realiza la valoración del protón liberado con la ruptura del enlace peptídico a determinados pHs.

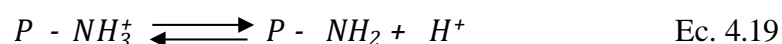
Cuando se hidroliza un enlace amido a pH alcalino, $7 < \text{pH} < 10$:



El grupo carboxilo terminal se disocia por completo:



Y los protones formados se reparten de acuerdo con el equilibrio de protonización de los grupos α -aminos liberados:



De acuerdo con el equilibrio anterior, se forma un mol de aniones monovalentes ($P-COO^-$) y un mol de cationes monovalentes repartidos entre las dos especies ($P-NH_3^+$ y H^+) por cada mol de aniones monovalentes. Al añadir la base para mantener constante el pH se neutralizan sólo los protones, que son sustituidos por el catión de la base, siendo por tanto los moles de base añadida equivalentes a los protones generados en la hidrólisis.

Mediante el equilibrio anterior se puede determinar la fracción de los enlaces amidos hidrolizados que debe ser neutralizada por la base para mantener constante el pH. Así se puede relacionar el consumo de base con el grado de hidrólisis de la proteína.

El grado de hidrólisis de proteínas (GH) se define como el cociente entre el número de enlaces peptídicos rotos y el número de enlaces peptídicos totales que contiene el sustrato proteico:

$$GH(\%) = \frac{h_{\text{enlaces peptídicos hidrolizados}}}{h_{\text{enlaces peptídicos totales}}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 4.20}$$

La relación entre el grado de hidrólisis y el consumo de base viene dada por la siguiente ecuación:

$$GH(\%) = \frac{B \cdot N_B}{M_P} \cdot \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{1}{h_{\text{total}}} \cdot 100 \quad \text{Ec. 4.21}$$

donde:

B = Consumo de base (l).

N_B = Normalidad de la base.

M_P = Masa de proteína (Nx 6,25 kg).

α = Grado de disociación de los grupos α -amino.

h_{total} = Número de enlaces peptídicos en la proteína (eqv/kg).

La masa de proteína, M_p , se calcula del siguiente modo:

$$M_P = m_{\text{muestra}} \left(1 - \frac{h_{\text{muestra}}}{100} \right) \left(\frac{P_{\text{muestra}}}{100} \right) \quad \text{Ec. 4.22}$$

donde

m_{muestra} = Cantidad de muestra de residuo de carnicería introducida en el reactor (kg).

h_{muestra} = Humedad de la muestra (%).

P_{muestra} = Contenido de proteína en la muestra seca (%).

El número de enlaces peptídicos en la proteína de carne es de 7.6 eqv/kg (Adler-Nissen, 1982).

El grado de disociación viene dado por:

$$a = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad \text{Ec. 4.23}$$

donde pK es la media de pK de los α -NH₂ grupos liberados durante la hidrólisis. Para polipéptidos, el pK de los α - NH₂ puede ser calculado en función de la temperatura mediante la siguiente expresión (Linder et al., 1995):

$$pK = 7,8 + \frac{(298-T)}{(298 T)} 2400 \quad \text{Ec. 4.24}$$

Diferentes valores de $1/\alpha$ para diversos pH y temperaturas se recogen en la tabla 4.3.

Tabla 4.3.- Factores $1/\alpha$ en función de la temperatura y del pH (Adler-Nissen, 1986)

pH	T/°C				
	25	30	40	50	60
6.5				5.00	3.50
7.0		5.00	3.00	2.27	1.79
7.5	2.59	2.27	1.63	1.40	1.25
8.0	1.50	1.40	1.20	1.13	1.08
8.5	1.36	1.13	1.06	1.04	1.03
9.0	1.05	1.04	1.02	1.01	1.01
9.5	1.02	1.01	1.01	1.00	1.00
10.0	1.01	1.00	1.00	1.00	1.00
10.5	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
11.0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

2) Hidrólisis de lípidos

Para seguir el proceso de hidrólisis de lípidos también se utilizó el consumo de base en función del tiempo. Con este método se realiza la valoración de los ácidos grasos libres (AGL) separados con la ruptura del enlace lipídico a determinados pHs (figura 4.22).

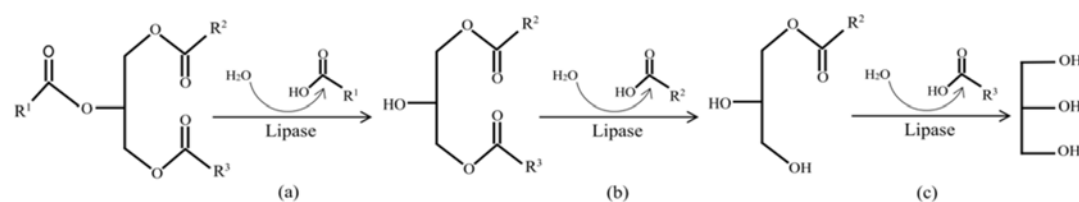


Figura 4.22.- Hidrólisis con lipasas de grasas en ácidos grasos más simples y glicerina: a) Hidrólisis inicial de triglicéridos en diglicéridos. b) Hidrólisis de diglicéridos en monoglicéridos. c) Hidrólisis final de monoglicéridos en ácidos grasos libres y glicerina (Canakci y Gerpen, 2001)

El grado de hidrólisis de lípidos (GH') se define como el cociente entre la cantidad de ácidos grasos liberados y la cantidad de ácidos grasos totales presentes en la muestra sin hidrolizar:

$$GH'(\%) = \frac{AG \text{ liberados}}{AG \text{ totales en la muestra}} 100 \quad \text{Ec. 4.25}$$

La relación entre el grado de hidrólisis y el consumo de base viene dada por la siguiente ecuación (Avelar *et al.*, 2013):

$$GH'(\%) = \frac{B \cdot M_B \cdot PM}{M_L} 100 \quad \text{Ec. 4.26}$$

donde:

B = Consumo de base (l).

M_B = Molaridad de la base (kmol/l).

PM = Peso molecular medio de los ácidos grasos en el residuo cárnico (kg/kmol).

M_L = Masa de lípidos puesta en el reactor (kg).

La masa de lípidos, M_L , se calcula del siguiente modo:

$$M_L = m_{muestra} \left(1 - \frac{h_{muestra}}{100} \right) \left(\frac{L_{muestra}}{100} \right) \quad \text{Ec. 4.27}$$

donde:

$m_{muestra}$ = Cantidad de muestra de residuo de carnicería introducida en el reactor (kg).

$h_{muestra}$ = Humedad de la muestra (%).

$L_{muestra}$ = Contenido de lípidos en la muestra seca (%).

El peso molecular medio de los ácidos grasos en el residuo cárnico está relacionado con índice de saponificación de la muestra sin hidrolizar por medio de la relación (Rodríguez *et al.*, 2016):

$$PM = \frac{56.000}{\text{Índice de saponificación de la muestra}} \quad \text{Ec. 4.28}$$

4.14. Desactivación de la enzima

Principio

Elevación de la temperatura de la mezcla hidrolizada a temperatura superior a 90°C durante un tiempo suficiente para finalizar la reacción por desactivación de la enzima (Timberlake, 2013) y pasteurizar la mezcla (temperaturas de 78°C durante 25 minutos son suficientes para la pasteurización, Himonides et al., 2011).

Aparatos y Materiales

- Agitador magnético-calefactor
- Baño de agua
- Seguidor magnético
- Vaso de precipitados de 500 ml

Procedimiento

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se traspasó el contenido del reactor a un vaso de precipitados que se introdujo en un baño con agua hirviendo situado encima del calefactor (figura 4.23). Con la finalidad de que el calentamiento fuera homogéneo se mantuvo la mezcla con agitación constante. Una vez alcanzada la temperatura de 96°C en la mezcla se mantuvo 20 minutos.

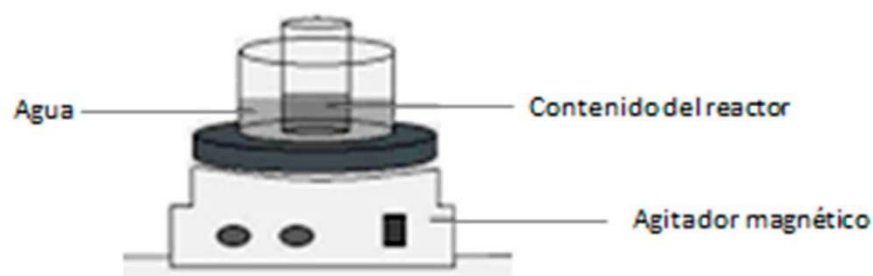


Figura 4.23. Montaje para desactivación de la enzima al finalizar la reacción

4.15. Separación y caracterización de fases

Principio

Centrifugación y filtrado de la mezcla hidrolizada para separar las fases formadas (Ollero de Castro, 2020) que serán posteriormente caracterizadas de acuerdo con los métodos previamente descritos.

Aparatos y Materiales

- Centrífuga Digicen 20
- Embudo Büchner de porcelana
- Kitasato de 500 ml
- Micropipeta de 1 ml
- Papel de filtro cualitativo circular grado 5
- Trompa de agua para vacío
- Tubos falcon 45ml
- Tubos de ensayo
- Vaso precipitado de 500 ml

Procedimiento

El procedimiento constó de dos etapas: centrifugado y filtrado.

1) *Centrifugado*

Una vez detenida la reacción de hidrólisis tras el calentamiento a 96°C, se llevó a cabo el vertido del contenido del reactor en tubos falcón de 45 ml, que se llenaron con volúmenes idénticos de 40 ml para evitar vibraciones dentro de la centrifuga que provocaran la parada de esta por desequilibrio de los tubos. Es importante recordar que el número de tubos colocados en la centrifuga siempre tiene que ser de par, ya que es necesario equilibrar el peso dentro del rotor de la centrifuga para evitar vibraciones y roturas de los tubos.

Los tubos así llenos se llevaron de 6 en 6 a una centrífuga Digicen 20 (figura 4.24) que se programó para centrifugar a 6000 rpm durante 20 minutos.



Figura 4.24. Centrifuga Digicen20

Se separaron tres fases mediante el proceso de centrifugado siendo la primera fase la capa sobrenadante que está compuesta por lípidos, la segunda fase la capa intermedia que está compuesta por la parte acuosa de la muestra que contiene la proteína solubilizada, y la tercera fase la sedimentada que está compuesta por el sólido no hidrolizado (figura 4.25).

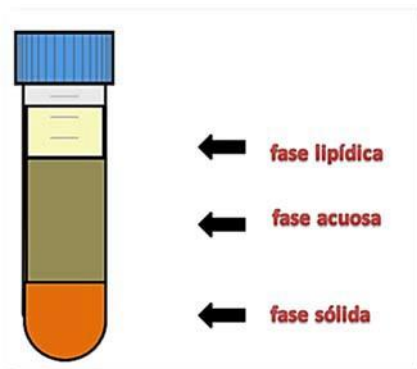


Figura 4.25. Fases obtenidas después del centrifugado

Después del centrifugado se separó la fase lipídica mediante una micropipeta y el resto se sometió al proceso de centrifugación de nuevo. Esta operación se repitió dos veces para conseguir separar de la manera más eficiente toda la fase lipídica, es decir, el hidrolizado procedente del reactor se sometió a tres centrifugaciones.

La fase lipídica obtenida en las tres centrifugaciones sucesivas se mezcló en un tubo de ensayo calibrado y se pesó constituyendo el total de lípidos separados tras cada experimento de hidrólisis.

2) Filtrado

La mezcla de la fase acuosa y la fase sólida se sometió a un proceso de filtrado mediante bomba de vacío para obtener una mejor separación. Se colocó la mezcla en un embudo Büchner de porcelana con filtro de papel grado 5 y se mantuvo el vacío hasta obtener un sólido seco (figura 4.25). El sólido seco fue recogido en un tubo de ensayo calibrado y fue pesado correspondiendo ese peso a la cantidad de residuo no hidrolizado.

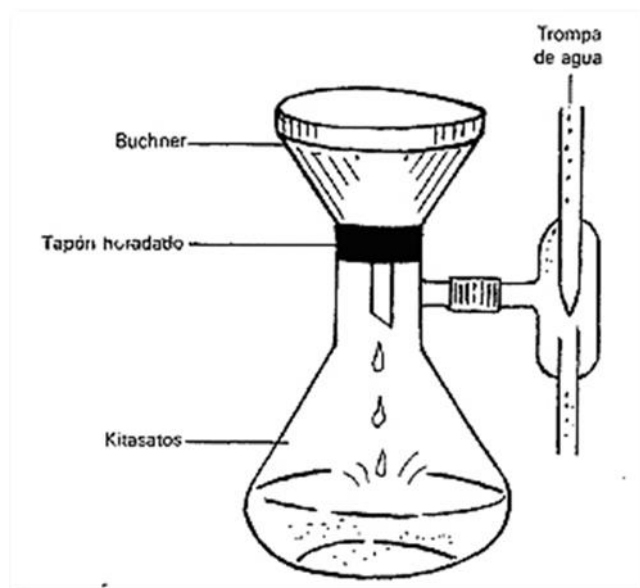


Figura 4.26. Etapa de filtración

Las fracciones separadas por centrifugación y filtración se etiquetaron y se mantuvieron a 4°C para el posterior análisis.

Los análisis realizados en esas fracciones fueron los siguientes:

- Fracción sólida: Colágeno no hidrolizado de acuerdo con el método descrito en el apartado 4.8.
- Fracción acuosa: Proteína solubilizada de acuerdo con el método descrito en el apartado 4.9 pero tomando 22 ml de líquido en lugar de 5 g de muestra y multiplicando el resultado obtenido en la ecuación 4.10 por la relación entre volumen de mezcla en reactor y volumen de líquido tomado para el ensayo (300 ml/22 ml).
- Fracción lipídica: Ácidos grasos de acuerdo con el método descrito en el apartado 4.10.

4.16. Tratamiento estadístico de los datos

Principio

Obtención de medidas de centralización, dispersión y tendencias en los datos recopilados (APHA, AWWA y WPCF, 1992).

Procedimiento

En el estudio estadístico se analizó tanto la distribución normal como el rechazo de resultados.

1) Distribución normal

Para un número infinito de medidas, la media o promedio de la distribución (μ) es la suma de todos los valores ($\sum f_i$) dividida por el número de valores acumulados (n), es decir:

$$\mu = \frac{\sum f_i}{n} \quad \text{Ec. 4.29}$$

La desviación estándar de la distribución normal (σ) se define como:

$$s = \left(\frac{\sum (f_i - \mu)^2}{n} \right)^{1/2} \quad \text{Ec. 4.30}$$

Dado que no era posible repetir un número infinito de veces las medidas, se realizó una estimación de la media, mediante el mismo procedimiento de suma, aunque con n igual al número finito de medidas repetidas. Esta estimación de μ se denota como \bar{f} :

$$\bar{f} = \frac{\sum f_i}{n} \quad \text{Ec. 4.31}$$

De modo análogo se estimó la desviación estándar para el número finito de observaciones realizadas; la estimación de σ se denota por s y se calcula del siguiente modo:

$$s = \left(\frac{\sum (f_i - \bar{f})^2}{n-1} \right)^{1/2} \quad \text{Ec. 4.32}$$

2) Rechazo de datos

Para determinar los resultados que diferían de manera significativa de los demás y, por ello, debían eliminarse, se ordenó de modo creciente el conjunto de datos $f_i < f_w < f_s$ y se calculó el promedio y la desviación estándar. Se examinaron los valores extremos superior e inferior indicativos de posible error mediante el siguiente procedimiento.

Se calculó en primer lugar la variable estadística T_E para el valor superior (ec. 4.33) y el valor inferior (ec. 4.34):

$$T_E = \frac{(x_s - \bar{x})}{s} \quad \text{Ec. 4.33}$$

$$T_E = \frac{(\bar{x} - x_i)}{s} \quad \text{Ec. 4.34}$$

donde:

\bar{f} = valor medio de la serie de medidas

f_s = valor superior de la serie de medidas

f_i = valor inferior de la serie de medidas

s = desviación estándar de la serie de medidas

En segundo término, se comparó el valor de T_E con el valor de la tabla 4.4 para los niveles de significación de 5% o 1%. Si el T calculado es mayor que el valor de la tabla para el número de medidas, n , entonces f_s o f_i es un valor extremo a ese nivel de significación. En todo este trabajo se rechazaron esos valores extremos.

Tabla 4.4. Valores críticos para pruebas de discordancia de 5% y 1% para un valor extremo simple en una muestra normal (APHA, AWWA y WPCF, 1992)

Número de medidas (n)	Valor crítico	
	5%	1%
3	1,15	1,15
4	1,46	1,49
5	1,67	1,75
6	1,82	1,94
7	1,94	2,10
8	2,03	2,22
9	2,11	2,32
10	2,18	2,41
12	2,29	2,55
14	2,37	2,66
15	2,41	2,71
16	2,44	2,75
18	2,50	2,82
20	2,56	2,88
30	2,74	3,10
40	2,87	3,24
50	2,96	3,34
100	3,21	3,60

CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización del sustrato

El sustrato utilizado en este trabajo han sido residuos cárnicos debido a su alto contenido en lípidos y proteínas lo que presenta la ventaja de poder transformarlos en productos de mayor valor añadido, reduciendo así su disposición final en vertedero lo cual constituye el objetivo de este trabajo.

Con la finalidad de facilitar el proceso de hidrólisis, el sustrato, recogido en una carnicería de la ciudad de Salamanca por ser representativo de la composición de los residuos cárnicos de la Comunidad de Castilla y León, se ha triturado para reducir su tamaño, se ha tamizado a un tamaño inferior a 1 mm y se ha homogeneizado mediante el método de cuarteo indicado en el apartado 4.2 de la metodología utilizada. De este modo se facilita el acceso de la enzima al sustrato favoreciendo el proceso de hidrólisis y nos aseguramos de que las muestras utilizadas y las caracterizaciones realizadas van a ser representativas.

En la caracterización del sustrato es fundamental conocer su contenido en proteína y lípidos ya que éstos van a ser los componentes que se van a transformar en productos de mayor valor añadido. No obstante, debido al origen del residuo, también es interesante la determinación del contenido en humedad, fibra, hidratos de carbono y cenizas.

En la tabla 5.1 aparece un resumen de los resultados obtenidos en la caracterización hecha a estos componentes de acuerdo con los análisis realizados cuyos resultados aparecen en las tablas I.1- I.5 del Anexo I. En dicho Anexo I, no aparecen los resultados del análisis del contenido en hidratos de carbono ya que se determinó por diferencia entre el 100 % y los porcentajes en base seca de los otros componentes (proteína, lípidos, fibra y ceniza).

Tabla 5.1.- Composición del sustrato

Parámetro	Valor*
Humedad (%)	45,04±1,21
Proteínas (%)*	19,03±0,42
Lípidos (%)*	68,91±1,14
Fibra (%)*	1,20±0,26
Carbohidratos (%)*	3,72±0,65
Cenizas (%)*	7,14±0,23

* Los porcentajes de esos parámetros están dados en base seca

Aunque la bibliografía sobre la caracterización de los residuos de carnicería es escasa, se ha encontrado un trabajo sobre el tema y sus resultados concuerdan con los obtenidos en este trabajo. Así, García et al. (2005), que hicieron un estudio sobre la caracterización de los residuos generados en 208 carnicerías, encontraron unos valores medios del 41,0±12,3 % en humedad, 24,6±10,3 % en proteína, 69,9±13,7 % en lípidos, 0,6±0,9 % en fibra y 4,9±4,1 % en cenizas.

Dentro de las proteínas del sustrato cabe destacar el colágeno por lo que se ha determinado específicamente su cantidad en el residuo seco, resultando ser 67,91±0,14 mg/g (tabla I.6 de Anexo I). Los mg de colágeno por g de residuo seco determinados en este estudio representan un 35,68 % del total de la proteína contenida en dicho sustrato lo que concuerda con el hecho de que el colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo de los mamíferos ya que constituye el 25% del total de la proteína corporal y el 95% de los elementos fibrosos del tejido conectivo (Pearson y Young, 1989) así como el 90 % de los huesos (Rogers et al., 1952); teniendo en cuenta que, en los residuos utilizados, el tejido conectivo y huesos están en mayor proporción de lo habitual en el cuerpo de los animales, no es de extrañar que el porcentaje de colágeno obtenido supere ligeramente el 25 % habitual en la proteína corporal.

Por otra parte, dentro de los lípidos hay que considerar los ácidos grasos que los constituyen y que han sido determinados cromatográficamente (tabla I.8 de Anexo I).

Dado que no existen datos en la bibliografía relativos al contenido en ácidos grasos en los residuos de carnicería, se hizo una revisión bibliográfica sobre el contenido en ácidos grasos en distintas carnes y grasas animales (Aldai et al., 2006; Ali et al., 2016; Bianchi et al., 2009; Bustamante, 2005; Cortinas, 2005; Cruz-González et al., 2014; Daza et al., 2014; Esquivelzeta et al., 2017; Ferreira et al., 2016; Ladeira et al., 2014; Montoya et al., 2015; Monje y Campos, 2006; Moo-Huchin et al., 2013; Muchenje et al., 2009; Real, 2018; Sosa, 2009).

En ella se observó cómo ese contenido variaba enormemente en función de que la muestra fuera de carne o de grasa y que también variaba mucho dependiendo del origen de la carne o de la grasa. Con todos los datos obtenidos se elaboró un intervalo de valores que se ha incluido en la tabla 5.2 en la que se comparan esos resultados con los obtenidos en esta tesis.

Como puede apreciarse, los porcentajes obtenidos para cada ácido graso están todos ellos dentro del intervalo de valores que muestra la bibliografía lo que parece indicar la coherencia de los resultados obtenidos, predominando los ácidos saturados (46,64 %) frente a los monoinsaturados (25,27 %) o poliinsaturados (28,09 %).

Tabla 5.2.- Distribución de ácidos grasos

Ácido graso	Valor medido en el residuo cárnico (%)	Valor mínimo-máximo bibliográfico (%)
C12:0	0,00±0,00	0,00-2,31
C14:0	4,25±0,09	1,70-32,9
C15:0	0,27±0,03	0,00-0,60
C16:0	25,45±0,26	2,28-36,89
C17:0	3,48±0,10	0,00-3,90
C18:0	12,85±0,24	0,40-33,80
C20:0	0,34±0,02	0,06-4,69
C14:1	0,00±0,00	0,00-2,38
C15:1	0,00±0,00	0,00-1,70
C16:1	0,30±0,01	0,00-37,9
C17:1	0,32±0,02	0,00-0,90
C18:1	24,64±0,34	0,84-46,29
C20:1	0,00±0,00	0,00-2,78
C22:1	0,00±0,00	0,00-0,67
C18:2	10,50±0,27	0,49-38,28
C20:2	1,76±0,05	0,00-2,57
C18:3	3,31±0,06	0,25-4,71
C20:3	3,88±0,08	0,07-4,82
C20:4	3,78±0,07	0,03-3,83
C22:4	0,00±0,00	0,00-0,44
C20:5	0,00±0,00	0,00-3,80
C22:5	0,00±0,00	0,00-22,50
C22:6	0,00±0,00	0,00-2,80

En la caracterización del sustrato también se analizaron otros parámetros como la densidad (tabla I.8 del Anexo I) para poder determinar posteriormente el volumen de sustrato puesto en el reactor de hidrólisis y el índice de saponificación (tabla I.9 del Anexo I) para poder determinar el peso molecular medio de los lípidos y de los ácidos grasos contenidos en ellos. En la tabla 5.3 aparecen los resultados obtenidos.

Tabla 5.3.- Densidad e índice de saponificación del sustrato, y peso molecular medio de lípidos y ácidos grasos

Parámetro	Valor
Densidad (g/ml)	1,19±0,15
Índice de saponificación	200,21±1,94
Peso molecular medio de lípidos	839,18±8,14
Peso molecular medio de ácidos grasos	279,73±2,71

Para el cálculo del peso molecular medio de los lípidos del residuo cárnico se ha considerado que el índice de saponificación de una grasa es inversamente proporcional a su peso molecular (Bahl, 2004) y para el cálculo del peso molecular medio de los ácidos grasos contenidos en esos lípidos se ha considerado que, al dividir por 3 el peso molecular promedio de una grasa se obtiene el peso molecular promedio de los ácidos grasos que contiene (Nielsen, 2003). Teniendo en cuenta que, en la reacción de saponificación, un mol de grasa reacciona con tres moles de KOH, cada mol de grasa consumirá 168.000 mg de KOH; por lo tanto (Rodríguez et al., 2016).

$$\text{Peso molecular medio de lípidos} = \frac{168.000}{\text{Índice de saponificación}} \quad \text{Ec. 5.1}$$

$$\text{Peso molecular medio de ácidos grasos} = \frac{56.000}{\text{Índice de saponificación}} \quad \text{Ec. 5.2}$$

5.2. Hidrólisis con proteasas

En el estudio de la hidrólisis de la proteína del residuo con proteasas se han analizado: el tipo y la concentración de enzima, la concentración de sustrato proteico, la relación enzima/sustrato, la temperatura, el pH y el tiempo de reacción.

Los equipos, métodos y procedimientos utilizados están descritos en el Capítulo IV de Materiales y Métodos. Con el fin de obtener datos fiables y reproducibles, todos los experimentos de hidrólisis se llevaron a cabo, como mínimo, por duplicado, y todos los análisis se llevaron a cabo, como mínimo, por triplicado apareciendo en este capítulo los valores medios de los resultados obtenidos que están detallados en el Anejo II.

5.2.1. Influencia del tipo de proteasa y el tiempo de hidrólisis

Se utilizaron cinco proteasas diferentes para realizar la hidrólisis enzimática de la parte proteica del sustrato indicado: Alcalase 2.4L, Flavourzyme 1000L, Neutrase 0.8L, Protamex y PTN. Todas ellas son proteasas comerciales (de Novozymes) aunque tienen distintas características. La elección se ha hecho en función de su acción catalítica (endopeptidasas y exopeptidasas), su fuente (fúngica, bacteriana o animal), la naturaleza del punto catalítico (proteínas serinas, aminopeptidasa y metaloproteasas) y su pH óptimo (neutras o alcalinas).

Alcalase 2.4 L es una enzima proteolítica producida mediante fermentación sumergida de una cepa seleccionada del *Bacillus licheniformis*. Su principal componente enzimático es Subtilisin Carlsberg, que es una endoproteinasa de tipo serínico (Camacho et al, 1992); su máxima actividad se presenta en un pH de 7 y 9, una temperatura entre 40 y 70°C (Novozymes, 2002); comercialmente se presenta en forma líquida con una densidad de 1,17 g/ml.

Flavourzyme 1000L es un complejo de proteasas de origen fúngico que procede de *Aspergillus oryzae*, con una acción endo-expopeptidasa y características de aminopeptidasa (Novozymes, 2015). Sus condiciones óptimas de operación son un pH óptimo de 5 – 7 y una temperatura en torno a 50°C (Novozymes, 2003); comercialmente se expende en estado líquido con una densidad de 1,27 g/ml.

Neutrased 0.8 L procede de una cepa seleccionada *Bacillus amyloliquefaciens*. Es una endoproteasa, con unas características de metaloproteasa. Su máxima actividad se da entre un pH de 5 – 7,5 y para temperaturas de 40 – 50°C (Acosta et al, 2015); se presenta como una preparación comercial en estado líquido con una densidad de 1,26 g/ml.

Protamex procede de una cepa seleccionada del *Bacillus licheniformis*, cuyo principal componente enzimático es una endoproteasa, el Subtilisin, y tiene unas características de serina proteasa (Varelis et al., 2019). Su máxima actividad está en el intervalo de pH de 6 – 8 y de temperatura de 50 – 65°C. La inactivación de esta proteasa se produce a 85°C durante 15 minutos (Sifuentes-Penagos et al., 2018), tras lo cual no existe actividad residual en el producto final; comercialmente se presenta en estado sólido por lo que la adición a la reacción debe contar con una preparación previa.

PTN (Pancreatic Trypsin Novo) es una enzima de origen animal, se encuentra en el sistema digestivo de distintos vertebrados y su principal componente enzimático es una endopeptidasa; esta enzima ataca a posiciones de carboxilo terminal de residuo de arginina y lisina de manera preferente. El pH óptimo para la reacción es de 7-9 y un rango de temperatura de 20-60°C (Guadix et al, 2000). Comercialmente se presenta en estado sólido por lo que se necesita preparar una disolución de la actividad enzimática específica para ser añadida al reactor.

Tabla 5.4.- Características de las proteasas utilizadas

ENZIMA	FUENTE	ACTIVIDAD CATALITICA	PUNTO CATALITICO	ESTADO	pH	T (°C)	Actividad enzimática* (UA/g)
Alcalase	Bacteriana	Endopeptidasa	Proteasa serina	Líquido	7,0 – 9,0	40-70	2,4
Protamex	Bacteriana	Endopeptidasa	Metaloproteasa + proteasa serina	Líquido	6,0 - 8,0	50-65	1,5
Flavouryme	Fúngica	Endo + exopeptidasa	Aminopeptidasa	Líquido	5,0 - 7,0	50	0,8
PTN	Animal	Endopeptidasa	Proteasa serina	Sólido	7,0 – 9,0	20 - 60	6,0
Neutrased	Bacteriana	Endopeptidasa	Metaloproteasa	Sólido	5,0 – 7,5	40 - 50	0,8

* Medida por el método Anson descrito en el apartado 4.11 del Capítulo IV.

Las condiciones de operación para llevar a cabo las hidrólisis han sido las mismas para todas las proteasas con la finalidad de comparar, en idénticas circunstancias, los resultados obtenidos en el proceso.

Estas condiciones de operación se establecieron en función de las características de las proteasas, seleccionando los valores de pH y temperatura para los cuales la práctica totalidad de las proteasas ensayadas muestran máxima actividad (tabla 5.4): pH de 8 y temperatura de 50°C.

Para la selección de la enzima más adecuada, se pueden seguir diferentes criterios: en función de su actividad (Kristinsson et al., 2000) o en función de la concentración necesaria para alcanzar un determinado grado de hidrólisis (Aspmo et al., 2005). En este trabajo se adoptó el primer criterio para elegir la enzima más conveniente para la hidrólisis de los residuos de carnicería, comparando los grados de hidrólisis obtenidos para una misma actividad inicial de proteasa en el reactor: $E_0 = 2.81 \text{ UA/l}$.

Dado que la actividad de las proteasas no era la misma para todas ellas (tabla 5.4), con el fin de obtener la misma actividad en el reactor, fue preciso añadir diferentes volúmenes de las mismas al reactor. En el caso de las proteasas sólidas fue preciso hacer previamente disoluciones de ellas que permitieran adicionar un volumen tal que la actividad enzimática inicial en el reactor fuera la deseada. Los volúmenes añadidos fueron: 0,30 ml de Alcalase 2.4L, 0,83 ml de Flavourzyme 1000 L, 0,84 ml de Neutrase 0.8 L, 10 ml de solución de 14,04 g/l de PTN 6.0 S y 10 ml de solución de 56,16 g/l de Protamex.

La concentración de sustrato proteico seleccionada se ha visto influida por las condiciones de agitación del sustrato en el reactor enzimático. Debido a las dificultades que dicha operación ha presentado, la concentración ensayada se ha fijado en $S_0 = 17,5 \text{ g/l}$ de proteína (166,67 g/l de residuo cárnico en el reactor).

Los experimentos de hidrólisis enzimática se llevaron a cabo en un reactor de mezcla completa encamisado de 0,5 l, según se indica en el apartado 4.13 del Capítulo IV de Materiales y Métodos. Para que el contacto entre el sustrato, el agua y la proteasa fuera

perfecto, se ensayaron varias velocidades de agitación seleccionándose un valor de 300 rpm.

El tiempo de hidrólisis se ha fijado mediante unos experimentos en los que se ha llevado a cabo la reacción durante cuatro horas. Como puede apreciarse en la figura 5.1, en la que se han representado los valores medios de uno de los experimentos (el realizado con PTN), la curva de hidrólisis no varía prácticamente desde las tres horas: en la última hora el grado de hidrólisis ha incrementado menos de un 1 %. Por ello se toma 4 horas como tiempo máximo de reacción.

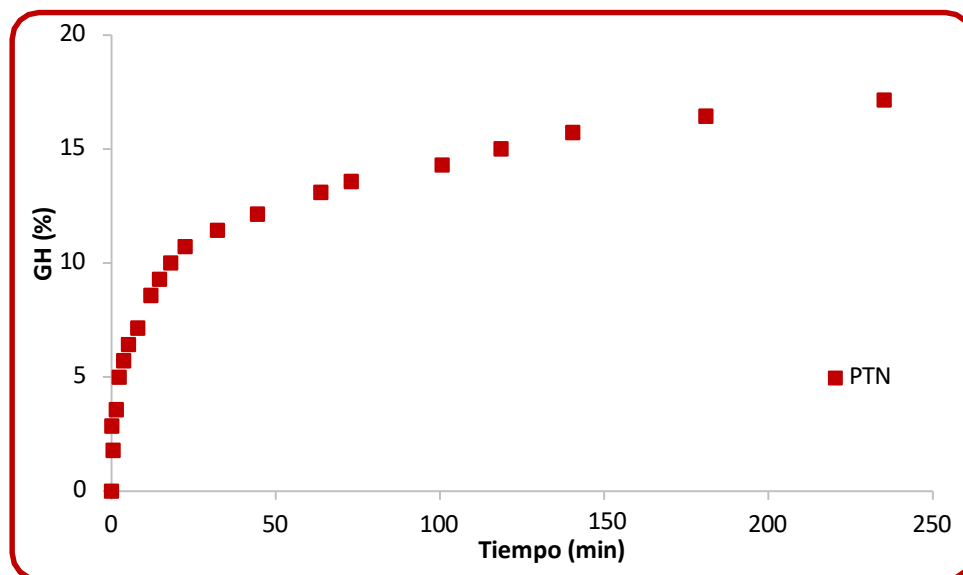


Figura 5.1.- Influencia del tiempo de reacción en la hidrólisis con proteasas de los residuos cárnicos

De acuerdo con lo indicado, se resumen en la tabla 5.5 las condiciones de operación utilizadas en este estudio.

Tabla 5.5.- Condiciones de operación para los análisis de hidrólisis enzimática con distintas proteasas

pH	8
Temperatura (°C)	50
Tiempo (min)	240
Velocidad de agitación (rpm)	300
So (g/l)	17,5
Eo (UA/l)	2,8

Para determinar la influencia de las proteasas en la hidrólisis enzimática se realizó el seguimiento del grado de hidrólisis (GH) con el tiempo determinando, para un tiempo de 4 horas, el GH máximo alcanzado y las cantidades de sólido no solubilizado, proteína solubilizada, colágeno en fase sólida, lípidos recuperados y composición en ácidos grasos.

5.2.1.1. Análisis de la influencia del tipo de proteasa en el grado de hidrólisis

El seguimiento del grado de hidrólisis (GH) se realizó según el método de pH-stato descrito en el apartado 4.13 del Capítulo IV de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos aparecen en las tablas IIA.1-IIA.5 del Anexo II.

En la figura 5.2 se puede observar cómo, al comienzo de la reacción, el grado de hidrólisis aumenta rápidamente debido a que hay muchos enlaces peptídicos susceptibles de ser rotos. A medida que pasa el tiempo de reacción, el aumento del grado de hidrólisis es menor ya que van quedando menos enlaces peptídicos para romper.

De la figura 5.2 se deduce también que, a pH 8 y 50°C, el GH obtenido presenta una variación entre el 7% y el 28%, siendo Alcalase la enzima con la que se consigue un valor más alto, seguida de Protamex, siendo Neutrased la menos eficaz

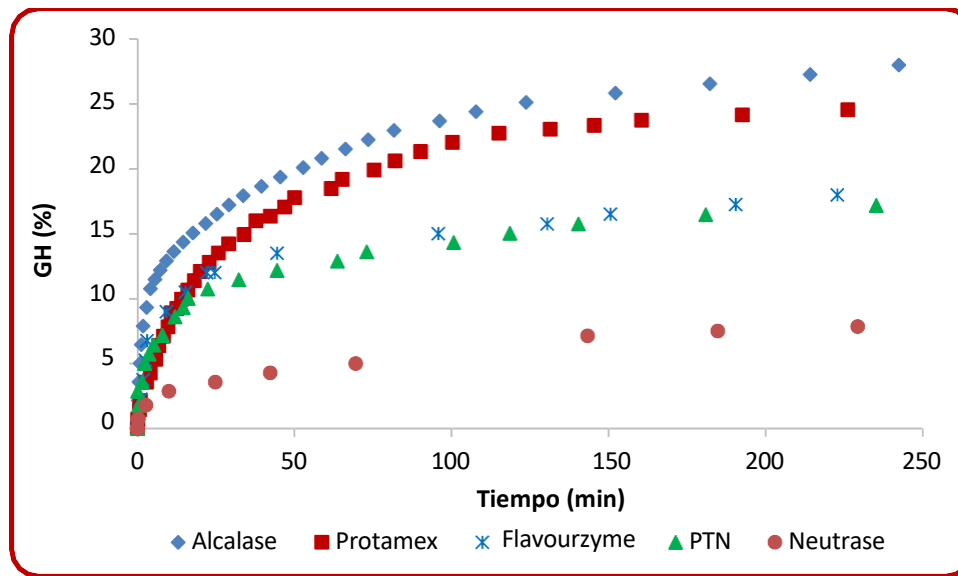


Figura 5.2.- Influencia del tipo de proteasa en el grado de hidrólisis (GH)

El diferente comportamiento de las proteasas puede justificarse en función de las características de las mismas (tabla 5.4).

Para poder refrendar estos resultados con la bibliografía y dado que no existen estudios previos sobre la hidrólisis de residuos cárnicos, se han utilizado estudios realizados sobre residuos de pescado que tienen características similares a las de los residuos cárnicos utilizados en este estudio en cuanto a contenido de proteínas, colágeno y grasas.

De las tres endopeptidasas de origen bacteriano analizadas (Alcalase, Neutrased, y Protamex), Neutrased resulta menos eficaz que las otras endopeptidasas lo que puede atribuirse a un papel importante y crítico de las proteasas serinas frente a las metaloproteasas para la hidrólisis de residuos cárnicos. Esto se demuestra en figura 5.2, donde Protamex (una preparación de proteasa serina y metaloproteasa) tiene una eficacia inferior a la de Alcalase (proteasa serina pura) pero claramente superior a la de Neutrased (metaloproteasa pura) si se desea un alto valor del GH.

Dentro de las endopeptidasas de origen bacteriano, también se puede apreciar que las proteasas alcalinas (Alcalase) resultan más adecuadas para la hidrólisis de los residuos cárnicos que las proteasas neutras (Protamex y Neutrase).

Otros autores también han observado estos resultados. Así, Safari y Motamedzadegan (2012) comprobaron cómo, en la hidrólisis de residuos de pescado, el GH alcanzado con Protamex era inferior (19 %) al alcanzado con Alcalase (34 %), y Kristinsson y Rasco (2000) evidenciaron la mayor eficacia de la Alcalase frente a la Neutrase lo que confirma la menor eficacia de las metaloproteasas frente a las serina-proteasas. Según un estudio realizado por Baez *et al.* (2016) sobre hidrólisis enzimática con un sustrato de vísceras de tilapia, utilizando tres proteasas distintas (Alcalase 2.4 L, Neutrase 1.5MG y Flavourzyme 500MG), la enzima que obtuvo un mayor grado de hidrólisis fue la Alcalase, alcanzando un GH del 31%, lo que confirma que las proteasas alcalinas, entre las que se encuentra la Alcalase 2,4L, muestran actividades mayores que las proteasas neutras, como Flavourzyme y Neutrase.

Si se comparan las proteínas serinas con actividad endopeptidasa en función de su origen, se puede apreciar que las de origen bacteriano, como Alcalase, permiten alcanzar un mayor GH en la hidrólisis de estos residuos que las de origen animal, como PTN. Este fenómeno también fue observado por Fallah *et al.* (2015) en un estudio sobre hidrólisis de residuos de carpa plateada en el que observaron que la Alcalase permitía obtener un mayor GH que la tripsina confirmándose así la mayor eficacia de las proteasas bacterianas frente a las de origen animal.

La enzima Flavourzyme, con unas características diferentes a las demás proteasas ensayadas en cuanto a origen (fúngico), actividad catalítica (endo+exopeptidasa), punto catalítico (aminopeptidasa) y carácter neutro, presenta una eficacia intermedia análoga a la de la enzima PTN que parece sugerir que su eficacia se puede asimilar a las de las proteasas serinas alcalinas de origen animal y actividad endopeptidasa. Kristinsson y Rasco (2000) señalaron también el excelente potencial de Flavourzyme para hidrolizar proteínas de pescado.

De acuerdo con todo esto se puede deducir que las endopeptidasas de tipo proteasa serina y origen bacteriano son las proteasas que permiten alcanza un mayor grado de hidrólisis en las condiciones de operación previamente definidas, siendo éstas las más adecuadas para la hidrólisis de la proteína de residuos cárnicos. De hecho, numerosos estudios acreditan la eficacia de la enzima Alcalase en la hidrólisis de residuos de pescado (Guérard et al., 2001; Bhaskar et al., 2008; Safari y Motamedzadegan, 2012).

La importancia de esto radica en que el mayor grado de hidrólisis en estos sustratos, va asociado al aumento de las cantidades de aminoácidos esenciales generadas, lo que incrementa el valor nutricional de los productos alimenticios derivados de los mismos (Kechaou, *et al.*, 2009).

Como se describe a continuación, el estudio de la recuperación de productos con mayor valor añadido a partir del residuo para las diferentes proteasas estudiadas ha demostrado que el parámetro determinante de dicha recuperación es el grado de hidrólisis alcanzado independientemente de la proteasa utilizada.

5.2.1.2. Análisis de la influencia del tipo de proteasa en la solubilización del residuo

De acuerdo con lo indicado en el apartado 4.15 del Capítulo IV de Materiales y Métodos, posteriormente a la hidrólisis, se separaron la fase líquida y la fase sólida contenidas en el reactor, secando y pesando la fase sólida y determinando el porcentaje de sólido que no se había solubilizado a partir de la relación entre esa cantidad de sólido seco que no se había solubilizado y la cantidad de residuo seco puesta inicialmente en el reactor (ver resultados en tabla IIA.6 del Anexo II).

Como se puede ver en la figura 5.3, el porcentaje de sólido no solubilizado depende claramente del grado de hidrólisis, pudiéndose observar que es inversamente proporcional al mismo.

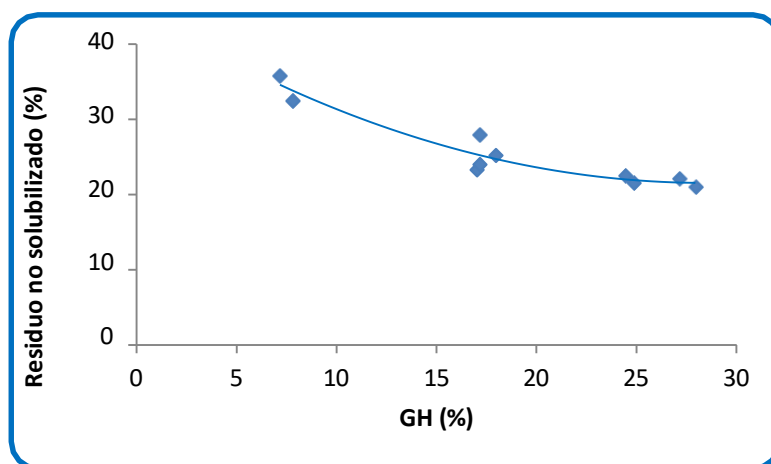


Figura 5.3.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas proteasas en el porcentaje de residuo no solubilizado

Este comportamiento se puede comprender cuando se analiza el porcentaje de proteína solubilizada (tabla IIA.7 del Anexo II). Como se indicó en el apartado 4.9 del Capítulo IV de Materiales y Métodos, la determinación del porcentaje de proteína solubilizada se realiza a partir de análisis de la fase líquida filtrada después de la hidrólisis enzimática del residuo cárnico según el método Kjeldahl que se basa en la cuantificación del contenido de nitrógeno en la muestra. Al contrario que el porcentaje de residuo no solubilizado, el porcentaje de proteína solubilizada presenta un claro aumento con el grado de hidrólisis (figura 5.4).

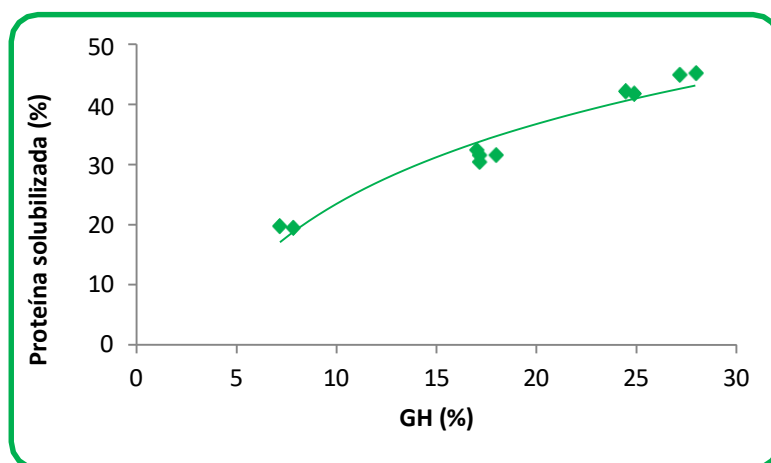


Figura 5.4.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas proteasas en el porcentaje de proteína solubilizada

Las proteínas nativas fibrosas son menos solubles en agua que las globulares, pero, incluso, no todas éstas son solubles en agua. Así, dentro de las proteínas globulares, sólo las albúminas son solubles en agua, ya que las globulinas son solubles en soluciones salinas diluidas, las glutelinas en soluciones de ácidos y bases diluidos y las prolaminas en soluciones acuosas de etanol (Cox y Nelson, 2007). La falta de solubilidad y su resistencia a la proteólisis es debida a su compacta estructura terciaria que protege la mayoría de los enlaces peptídicos (Cox y Nelson, 2007). En su forma desnaturalizada, los enlaces peptídicos están expuestos y disponibles para la ruptura por las proteasas. En disolución, como ocurre en este estudio, la molécula de proteína nativa, debido a su flexibilidad, está en un equilibrio dinámico con un número de formas más o menos distorsionadas algunas de las cuales son tan diferentes que pueden considerarse desnaturalizadas y, por tanto, accesibles al ataque enzimático. La ruptura de uno o varios enlaces desestabiliza la molécula produciéndose un desdoblamiento irreversible por el cual quedan expuestos más enlaces peptídicos y las cadenas polipeptídicas se degradan extensivamente a péptidos intermedios de acuerdo con las características cinéticas del sistema enzima-sustrato, aumentando así su solubilidad (Adler-Nissen, 1976).

Dado que el grado de hidrólisis es indicativo del número de enlaces peptídicos rotos (Adler-Nissen, 1986), cuanto mayor sea su valor, más enlaces se habrán roto aumentando así la cantidad de proteína solubilizada y disminuyendo la cantidad de residuo que no se ha hidrolizado justificándose así los resultados obtenidos.

Puesto que la Acalasa es la enzima que ha permitido obtener el GH más elevado, es obvio que las endopeptidasas de tipo proteasa serina y origen bacteriano son las proteasas que permiten alcanzar una mayor solubilización del residuo en las condiciones de operación previamente definidas, siendo éstas las más adecuadas para la hidrólisis de la proteína de residuos cárnicos.

5.2.1.3. Análisis de la influencia del tipo de proteasa en la recuperación de colágeno

La cantidad de colágeno recuperado se determinó en la fase sólida separada después de la hidrólisis una vez seca. Su determinación se llevó a cabo según el método

indicado en el apartado 4.8 del Capítulo IV de Materiales y Métodos y los resultados obtenidos aparecen en la tabla IIA.8 del Anexo II.

Al igual que en el caso anterior, la cantidad de colágeno recuperada depende, de manera marcada, del grado de hidrólisis alcanzado durante el proceso. Tal y como puede verse en la figura 5.5, la cantidad de colágeno que permanece sin hidrolizar en el residuo no solubilizado es inversamente proporcional al grado de hidrólisis alcanzado.

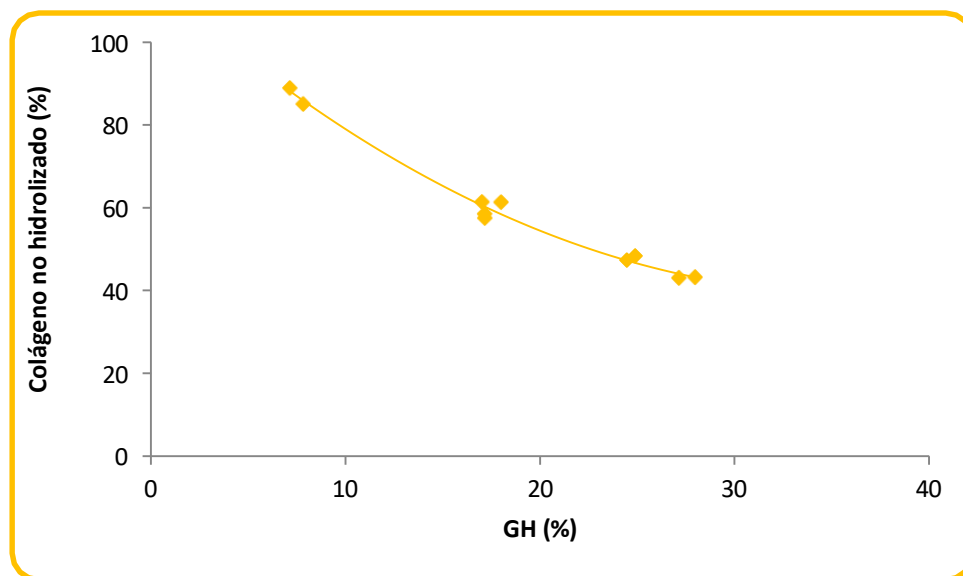


Figura 5.5.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas proteasas en el porcentaje colágeno no hidrolizado

El colágeno es una proteína fibrosa cuyo comportamiento frente a la hidrólisis es diferente al de las proteínas globulares. Mientras éstas son más fácilmente hidrolizables dadas sus características, el colágeno es menos soluble y más difícil de hidrolizar en su estado nativo lo que hace que su grado de hidrólisis difiera del de las otras proteínas que constituyen los residuos cárnicos (Calvo, 2019).

El hecho de que el colágeno sea más difícil de hidrolizar hace que, aunque una parte se haya hidrolizado, haya otra parte que permanece sin hidrolizar en la fase sólida y puede recuperarse para aplicaciones industriales. En la figura 5.5 puede apreciarse cómo para un GH bajo, el porcentaje del colágeno presente en el residuo que se ha hidrolizado es muy pequeño quedando prácticamente la totalidad sin hidrolizar. Esto se invierte a medida que aumenta el grado de hidrólisis en cuyo caso aumenta la cantidad de colágeno hidrolizado disminuyendo el porcentaje del total que queda sin hidrolizar.

Como ya se indicó anteriormente, la falta de estudios previos sobre la hidrólisis de residuos cárnicos ha hecho necesario utilizar estudios realizados sobre residuos con características similares a las de los residuos cárnicos, para poder justificar los resultados obtenidos.

La dificultad de la hidrólisis del colágeno ha sido confirmada por otros autores quienes han comprobado cómo para conseguir la hidrólisis del colágeno era preciso utilizar cantidades muy elevadas de proteasas y altos tiempos de hidrólisis (Hema *et al.*, 2017; Iltchenko *et al.*, 2017). Estudios realizados con pieles de pescados utilizando Alcalase como enzima han dado rendimientos de colágeno recuperados del mismo orden del obtenido en este trabajo (Hartina *et al.*, 2017).

En este caso, una mayor recuperación de colágeno implicaría un menor grado de hidrólisis por lo que ese proceso se vería favorecido por la utilización en la hidrólisis de endopeptidasas de tipo metaloproteasas y origen bacteriano como la Neutrase.

5.2.1.4. Análisis de la influencia del tipo de proteasa en la recuperación de lípidos y distribución de ácidos grasos

En cuanto a la determinación de los lípidos separados en la hidrólisis enzimática para su posterior aprovechamiento, se realizó mediante centrifugación (según se ha mencionado en la técnica analítica en el apartado 4.15 del Capítulo IV de Materiales y Métodos) obteniendo de ese modo la fracción de grasa recuperada que se utilizó para el posterior análisis de ácidos grasos de acuerdo con lo indicado en el apartado 4.10. Los resultados del porcentaje de lípidos recuperados y de la distribución de ácidos grasos en los mismos están incluidos en las tablas IIA.9 y IIA.10 del Anexo II, respectivamente.

En la figura 5.6 se puede ver el porcentaje de lípidos recuperados con cada una de las proteasas utilizadas.

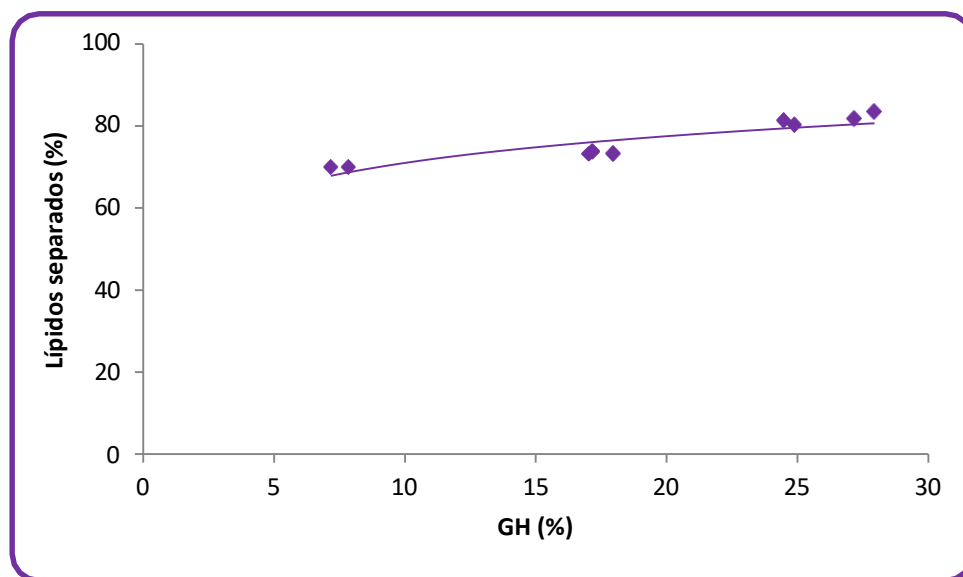


Figura 5.6.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas proteasas en el porcentaje lípidos recuperados

Los resultados obtenidos parecen indicar que no existe una clara influencia entre las características de la enzima y la recuperación de lípidos. De acuerdo con esos resultados, Alcalase y Protamex resultan más adecuadas para la recuperación de lípidos de los residuos cárnicos. Esto ya fue comprobado por otros investigadores como Batista *et al.* (2014) quienes, en un estudio sobre hidrólisis de residuos de pescado con características análogas a los residuos estudiados, observaron una mayor liberación de lípidos al utilizar Alcalase o Protamex que cuando empleaban Neutrased como enzima hidrolítica.

Lo que sí se confirma es una relación entre el grado de hidrólisis alcanzado y la cantidad de lípidos recuperados (figura 5.6). Desde un punto de vista químico, las proteasas rompen los enlaces proteicos lo que produce la liberación de los lípidos contenidos en el residuo cárnico. Cuanto mayor es esa ruptura, mayor es el valor del GH alcanzado y mayor cantidad de lípidos serán liberados. Obviamente, la relación será asintótica tendiendo al valor máximo del 100 % de lípidos recuperados. Meng *et al.* (2018) encontraron resultados análogos en un estudio en el que relacionaron el grado de hidrólisis con la cantidad de lípidos liberados al hidrolizar canola con las mismas proteasas utilizadas en nuestro estudio (Flavourzyme, Neutrased, Protamex, y Alcalase).

Posteriormente a la recuperación de grasa, se realizó la determinación de la distribución de ácidos grasos en las muestras analizadas de acuerdo con lo indicado en el apartado 4.10 del Capítulo IV de Materiales y Métodos. Los resultados de los cromatogramas están recogidos en la tabla IIA.10 del Anexo II.

En la tabla 5.6 se puede observar la distribución de ácidos grasos que contienen los lípidos extraídos con las distintas proteasas ensayadas.

Tabla 5.6.- Distribución de ácidos grasos en lípidos recuperados con distintos tipos de proteasas

Ácido	Alcalase	Neutrased	Flavourzyme	Protamex	PTN
	Media± Desviación	Media± Desviación	Media± Desviación	Media± Desviación	Media± Desviación
C14:0	4,23±0,04	4,14±0,06	4,31±0,10	4,37±0,11	4,25±0,10
C14:1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
C15:0	0,22±0,00	0,38±0,01	0,39±0,01	0,26±0,04	0,30±0,01
C15:1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
C16:0	25,36±0,28	25,93±0,24	25,38±0,52	25,13±0,48	25,24±0,18
C16:1	0,20±0,01	0,35±0,01	0,28±0,01	0,58±0,03	0,19±0,01
C17:0	3,57±0,04	3,80±0,08	3,41±0,04	3,82±0,10	3,46±0,08
C17:1	0,33±0,01	0,38±0,03	0,49±0,02	0,51±0,01	0,29±0,03
C18:0	12,98±0,17	13,05±0,27	12,48±0,31	12,36±0,28	12,84±0,37
C18:1n9c+t	24,55±0,24	24,20±0,27	24,72±0,61	24,38±0,78	24,95±0,24
C18:2n6c+t	10,63±0,21	10,67±0,27	10,83±0,25	10,71±0,21	10,77±0,33
C18:3n3	0,23±0,00	0,33±0,01	0,31±0,03	0,56±0,03	0,20±0,00
C18:3n6	3,07±0,07	2,93±0,01	2,81±0,06	3,12±0,06	3,26±0,06
C20:0	0,34±0,01	0,42±0,01	0,51±0,01	0,43±0,01	0,38±0,03
C20:1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
C20:2	1,81±0,06	1,92±0,04	1,98±0,04	1,91±0,04	2,04±0,06
C20:3n3	4,83±0,11	4,47±0,06	4,83±0,17	4,51±0,10	4,86±0,08
C20:3n6+c21:0	3,89±0,08	3,12±0,14	3,56±0,06	3,51±0,06	3,18±0,04
C20:4n6	3,76±0,08	3,91±0,11	3,53±0,07	3,84±0,08	3,79±0,10
AGS	46,70±0,47	47,72±0,65	46,48±0,25	46,37±0,61	46,47±0,49
AGI	53,30±0,74	52,28±0,62	53,52±0,37	53,63±0,99	53,53±0,49

AGS: Ácidos grasos saturados

AGI: Ácidos grasos insaturados

Independientemente del tipo de proteasa utilizada, el análisis del perfil de ácidos grasos en los lípidos recuperados tras la hidrólisis indica que no hay cambio significativo respecto a la composición de la grasa del residuo antes de ser hidrolizado (tabla 5.2) manteniéndose la misma distribución de ácidos grasos. Por tanto, la hidrólisis con proteasas parece ser un medio efectivo para la recuperación de los lípidos sin afectar su calidad.

Lamentablemente, no existen referencias bibliográficas que refrenden estos resultados porque ningún investigador ha analizado la influencia de distintos tipos de proteasas en la recuperación de ácidos grasos presentes en residuos de carnicería; sin embargo, estudios realizados con residuos de pescado con características análogas a los residuos ensayados en nuestro trabajo confirman que una hidrólisis con proteasas no altera el perfil de ácidos grasos del aceite recuperado (Hathwar *et al.*, 2011).

5.2.2. Influencia de la concentración inicial de proteasa

En función de los resultados obtenidos anteriormente, la proteasa seleccionada para hacer el estudio de la influencia de la concentración de enzima en el proceso ha sido la Alcalase 2.4L que es la que permite obtener un mayor grado de hidrólisis en el proceso. Las condiciones de operación para llevar a cabo las hidrólisis han sido las mismas para todas las concentraciones de proteasa con la finalidad de comparar, en idénticas circunstancias, los resultados obtenidos en el proceso.

Estas condiciones de operación se establecieron en función de las características de la enzima, seleccionando los valores de pH y temperatura en los cuales la Alcalase muestra máxima actividad (tabla 5.4) y estabilidad: pH de 8 y temperatura de 50°C. Aunque la actividad de la enzima es mayor a 60°C que a 50°C (Novozymes, 2002), la desactivación que se produce con el tiempo es tan elevada que la eficacia del proceso es mayor a 50°C dado el tiempo que se mantiene la reacción (figura 5.7).

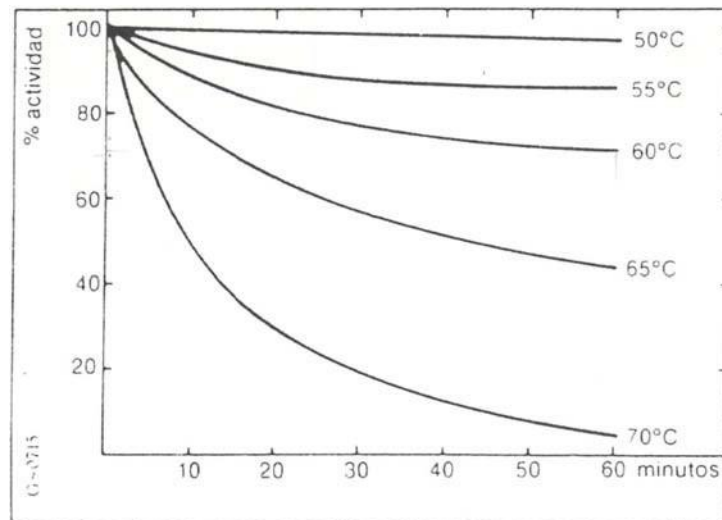


Figura 5.7.- Desactivación de Alcalase con la temperatura y el tiempo (Novozymes, 2002)

Por los mismos motivos que en el estudio de la influencia del tipo de enzima, la concentración de sustrato proteico seleccionada se ha fijado en $S_o = 17,5$ g/l de proteína (166,67 g/l de residuo cárnico en el reactor).

Se han utilizado concentraciones de enzima iniciales en el reactor (E_o) en torno a la fijada en los ensayos sobre la influencia del tipo de enzima. Ya que esta concentración era 2,8 UA/l, el intervalo en el que se ha trabajado ha sido 0,9-4,7 UA/l.

La duración de la hidrólisis y la agitación han sido las mismas que en los estudios previos.

Para determinar la influencia de la concentración de Alcalase en la hidrólisis enzimática se realizó el seguimiento del grado de hidrólisis (GH) con el tiempo determinando, para un tiempo de 4 horas, el GH máximo alcanzado y las cantidades de sólido no solubilizado, proteína solubilizada, colágeno en fase sólida y lípidos recuperados.

Los resultados obtenidos (tablas IIB.1-IIB.5 del Anexo II) permiten apreciar un claro aumento del grado de hidrólisis al aumentar la concentración de enzima que implica un incremento medio del 18 % en el grado de hidrólisis al aumentar una unidad la concentración de enzima (figura 5.8). Este resultado es consistente con que una mayor

cantidad de enzima en el reactor permite, para una misma concentración de sustrato, aumentar el número de enlaces enzima-sustrato formados propiciando un elevado número de enlaces peptídicos rotos, favoreciendo la hidrólisis y generando un aumento en la cantidad de hidrolizado producido. El incremento del GH con la concentración de enzima está refrendado por la bibliografía ya que varios autores lo han observado al trabajar con Alcalase 2.4L. Así Guérard *et al.* (2001) lo comprobaron en la hidrólisis de residuos de atún y Zapata *et al.* (2018) en la hidrólisis de vísceras de tilapia.

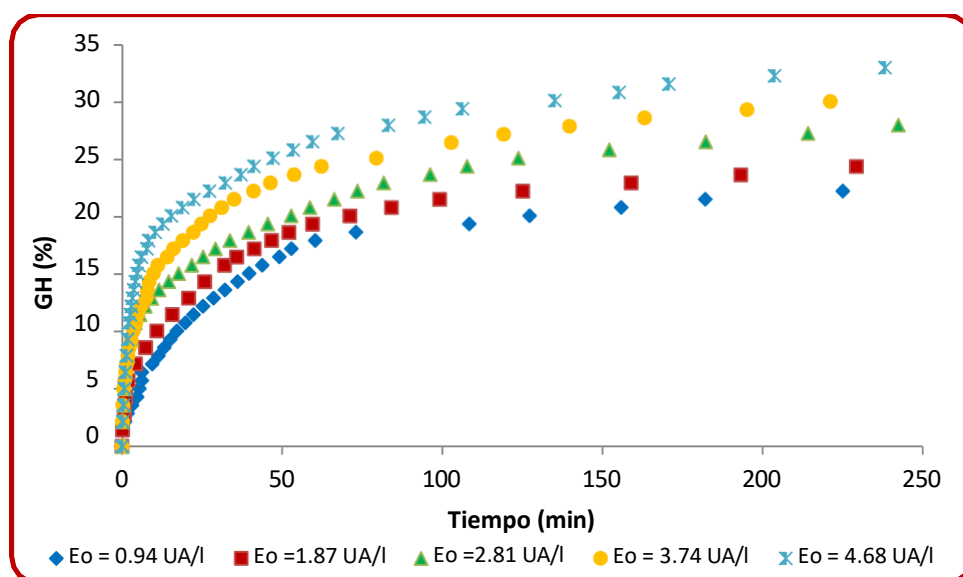


Figura 5.8.- Influencia de la concentración inicial de Alcalase en el grado de hidrólisis (GH)

El resultado obtenido parece recomendar la utilización de concentraciones de enzima lo más altas posible. Sin embargo, la representación del GH frente a la concentración inicial de enzima (figura 5.9) muestra una tendencia asintótica que indica que un aumento de la concentración inicial de enzima por encima de un determinado valor no estaría justificado debido a un coste económico excesivamente alto. Esta tendencia asintótica también ha sido comprobada por Kittikunet *al.* (2012) al hidrolizar con Alcalase 2.4 L residuos generados en fábricas de surimi.

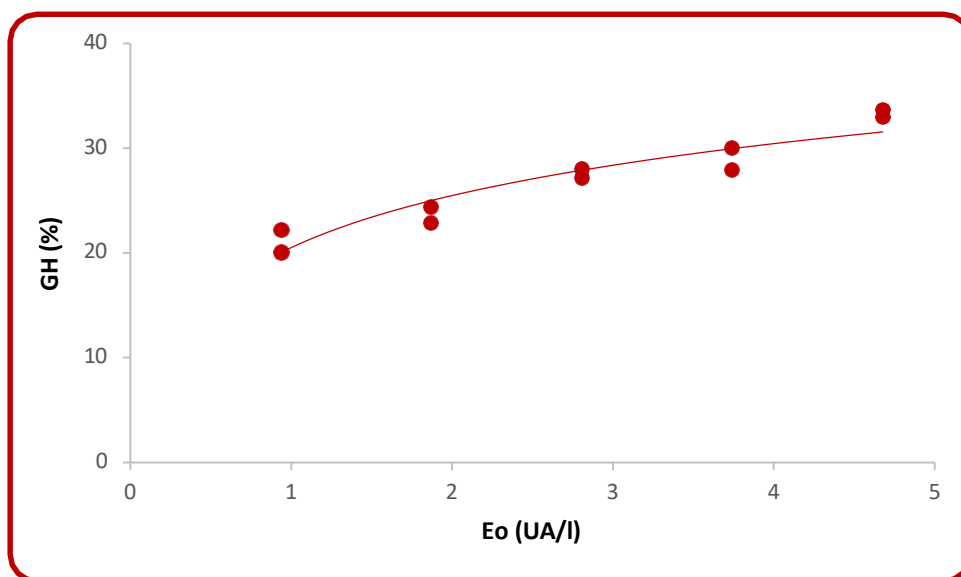


Figura 5.9.- Relación entre el grado de hidrólisis (GH) y la concentración inicial de Alcalase

Por otra parte, se pudo observar una clara relación inversa entre la cantidad de residuo no solubilizado y la concentración inicial de Alcalase utilizada en la hidrólisis (tabla IIB.6 del Anexo II), justificable por el hecho, ya comentado, de que la presencia de enzima favorece la hidrólisis generando un aumento en la cantidad de hidrolizado producido lo que hace que disminuya la cantidad de sólido no solubilizado como consecuencia de la mayor aparición de proteínas solubilizadas (tabla IIB.7 del Anexo II).

Existe también una relación inversa entre el grado de hidrólisis y el sólido no solubilizado (figura 5.10) o la proteína solubilizada (figura y 5.11) ya que al ser el GH indicativo del número de enlaces péptidicos rotos (Adler-Nissen, 1986), cuanto mayor sea su valor, más enlaces se habrán roto aumentando así la cantidad de proteína solubilizada y disminuyendo la cantidad de residuo que no se ha hidrolizado justificándose así los resultados obtenidos como se indicó en el apartado anterior.

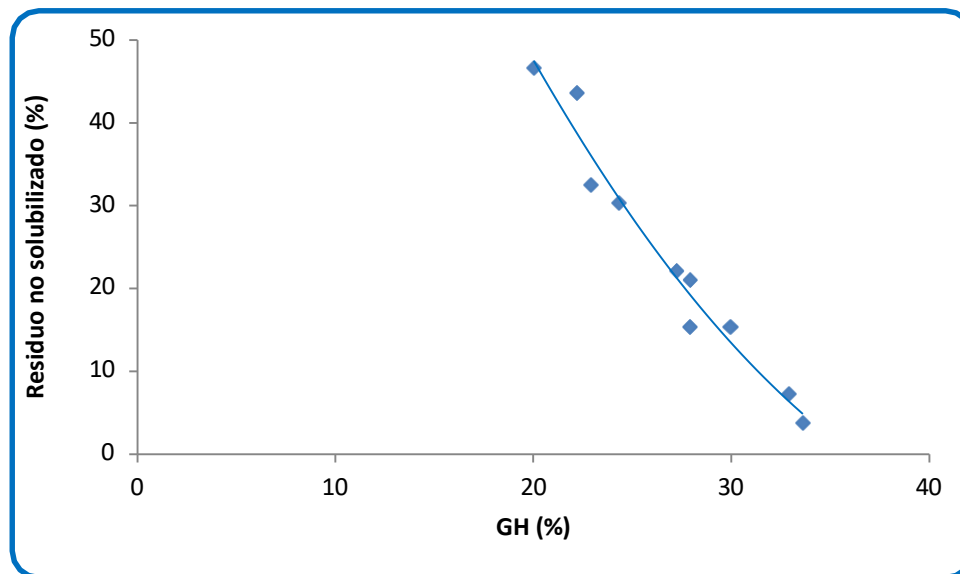


Figura 5.10.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Alcalase en el porcentaje de residuo no solubilizado

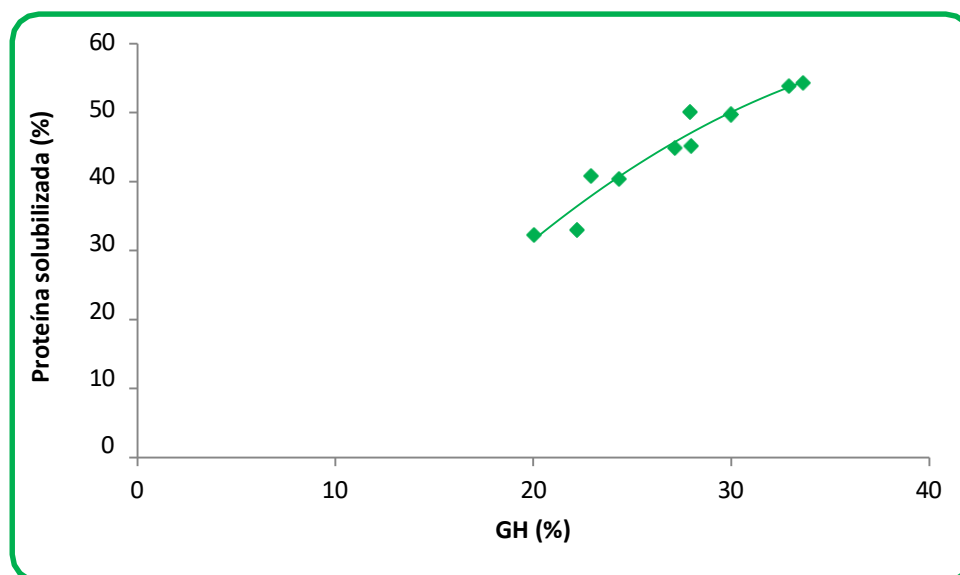


Figura 5.11.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Alcalase en el porcentaje de proteína solubilizada

La cantidad de colágeno recuperada también depende, de manera marcada, de la concentración inicial de enzima utilizada durante el proceso (tabla IIB.8 del Anexo II). Tal y como puede verse en la figura 5.12, la cantidad de colágeno que permanece sin hidrolizar en el residuo no solubilizado es inversamente proporcional al grado de hidrólisis alcanzado para las distintas concentraciones de proteasa.

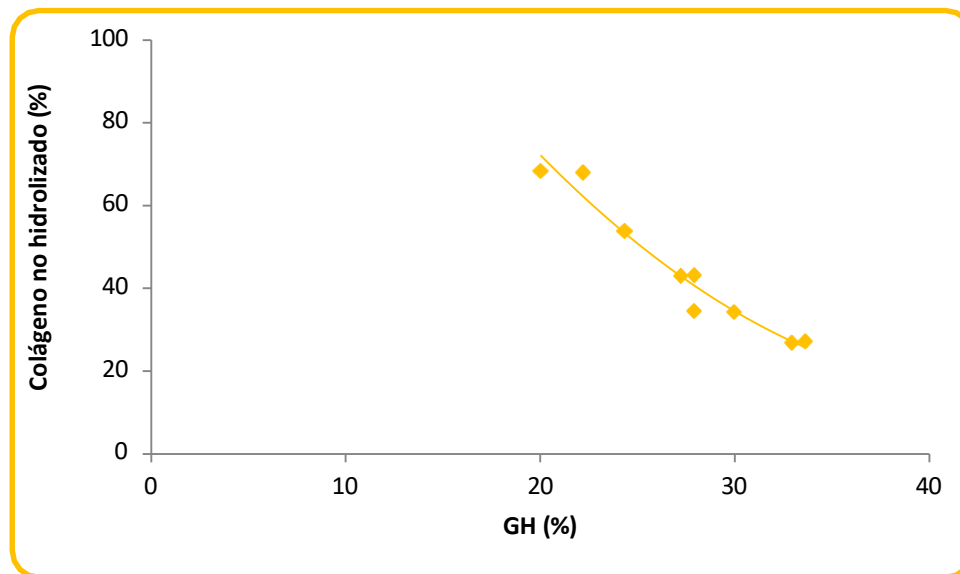


Figura 5.12.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Alcalase en el porcentaje de colágeno no hidrolizado

Como ya se indicó en el estudio de la influencia del tipo de proteasa, el colágeno es una proteína fibrosa cuyo comportamiento frente a la hidrólisis es diferente al de las proteínas globulares. Mientras éstas son más fácilmente hidrolizables dadas sus características, el colágeno es menos soluble y más difícil de hidrolizar en su estado nativo lo que hace que para su hidrólisis sea necesaria una concentración más elevada de enzima (Hema *et al.*, 2017). Por ello, para una mayor recuperación de colágeno para aplicaciones industriales, sería conveniente trabajar con concentraciones iniciales de Alcalase bajas.

Los resultados obtenidos en el análisis de lípidos indican una clara influencia entre la concentración inicial de enzima y la recuperación de lípidos (tabla IIB.8 del Anexo II). Obviamente, la relación es asintótica tendiendo al valor máximo del 100 % de lípidos recuperados para los grados de hidrólisis más altos alcanzados (figura 5.13) correspondientes a concentraciones de Alcalase superiores a 4 UA/l. La recuperación de lípidos está relacionada con la solubilidad de la proteína: un aumento en la solubilidad de proteína después de la hidrólisis favorece la separación de la grasa cuya cantidad en la fase superior se incrementa más de un 60 % en el intervalo de concentración de enzima estudiado.

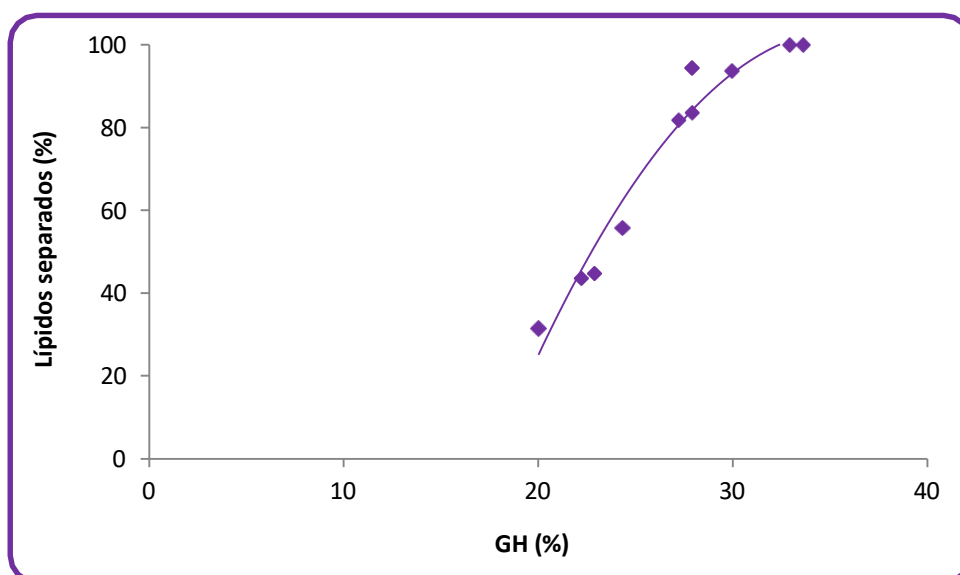


Figura 5.13.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Alcalase en el porcentaje de lípidos recuperados

Dado que, como se indica posteriormente, el parámetro determinante del proceso ha resultado ser la relación entre la concentración inicial de enzima y la de sustrato, el análisis de la distribución de ácidos grasos que contienen los lípidos extraídos con las distintas concentraciones de Alcalase ensayadas (tabla IIB.10 del Anexo II) se comentará en el apartado 5.2.4.

5.2.3. Influencia de la concentración inicial de sustrato proteico

Al igual que en el estudio de la influencia de la concentración de enzima, la proteasa utilizada en el estudio de la influencia de la concentración de sustrato proteico (S_0) en el proceso ha sido la Alcalase 2.4L que es la que permite obtener un mayor grado de hidrólisis en el proceso. Las condiciones de operación para llevar a cabo las hidrólisis (pH, temperatura y tiempo de hidrólisis) han sido las mismas que en el estudio anterior con la finalidad de comparar, en idénticas circunstancias, los resultados obtenidos en el proceso: pH = 8, T = 50°C, t = 240 min.

La concentración inicial de enzima utilizada ha sido la misma que en el estudio de la influencia del tipo de enzima: $E_0 = 2,81$ UA/l.

Se han utilizado concentraciones iniciales de sustrato proteico en el reactor (S_0) en torno a la fijada en los ensayos sobre la influencia del tipo y la concentración de enzima. Ya que esta concentración era 17,5 g/l, el intervalo en el que se ha trabajado ha sido 3-35 g/l de proteína en el reactor (30-300 g/l de residuo cárnico en el reactor). No se pudo trabajar con concentraciones más elevadas de sustrato debido a los problemas de agitación por ellas generadas en el reactor.

Para determinar la influencia de la concentración de sustrato proteico en la hidrólisis enzimática se realizó el seguimiento del grado de hidrólisis (GH) con el tiempo determinando, para un tiempo de 4 horas, el GH máximo alcanzado y las cantidades de sólido no solubilizado, proteína solubilizada, colágeno en fase sólida y lípidos recuperados.

Los resultados obtenidos (tablas IIC.1-IIC.5 del Anexo II) indican una clara disminución del grado de hidrólisis al aumentar la concentración de sustrato proteico: el grado de hidrólisis varía desde un 22,97 % para una concentración de 32,10 g/l hasta un 42,49 % obtenido cuando la concentración inicial de sustrato es 3,45 g/l, pasando por valores intermedios para cada una de las concentraciones utilizadas (figura 5.14).

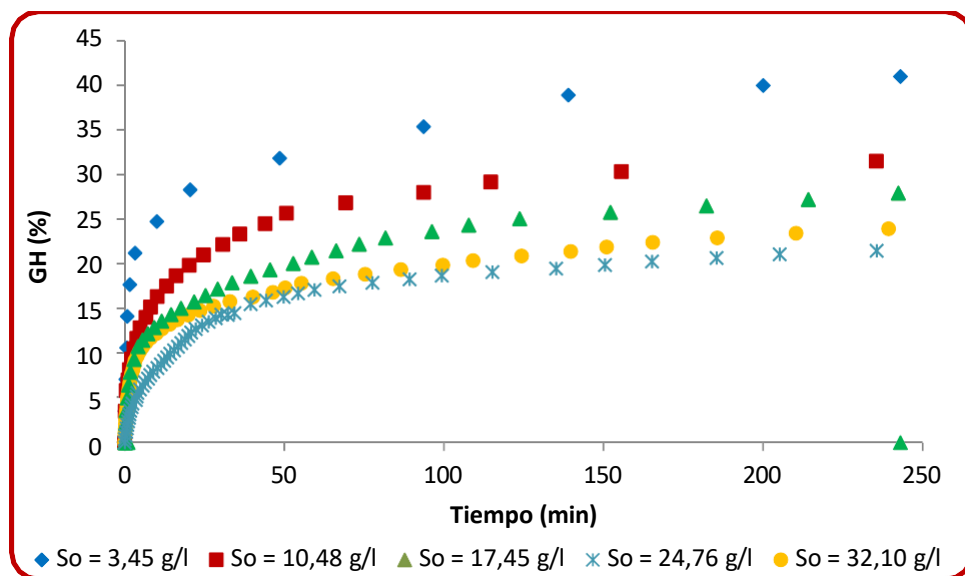


Figura 5.14.- Influencia de la concentración inicial de sustrato proteico en el grado de hidrólisis (GH)

Según esto, un aumento de nueve veces de la concentración de sustrato proteico ha provocado una disminución del grado de hidrólisis en torno al 50 % cuando la concentración inicial de enzima se mantiene constante (figura 5.15).

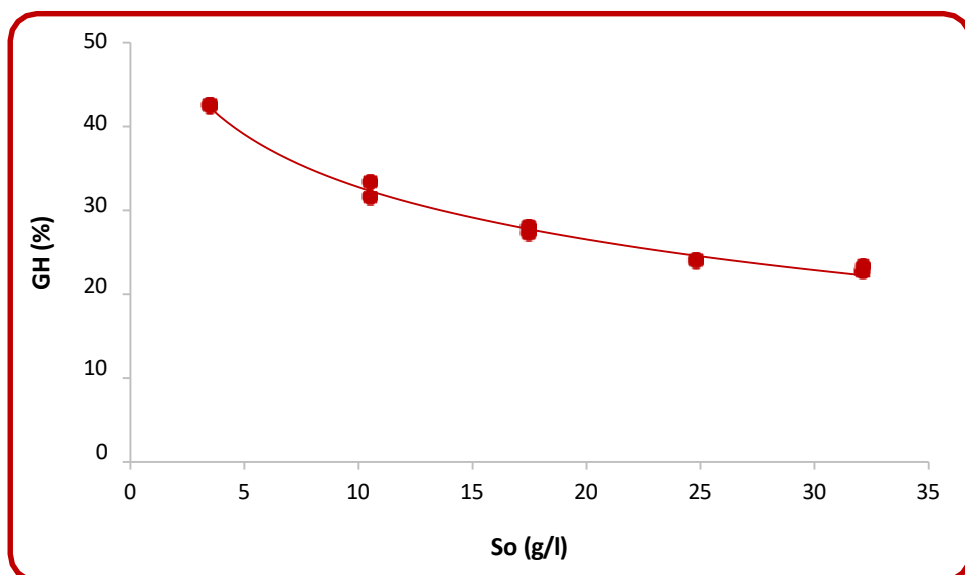


Figura 5.15.- Relación entre el grado de hidrólisis (GH) y la concentración inicial de sustrato proteico

A pesar de que el número de enlaces peptídicos rotos aumenta con la concentración de sustrato proteico (tal y como puede comprobarse por el consumo de base en las tablas IIC.1-IIC.5 del Anexo II), debido a que el número inicial de los mismos es más elevado, el grado de hidrólisis es menor.

Este efecto, en principio contradictorio a lo que cabría esperar (a mayor concentración de sustrato mayor grado de hidrólisis) y que parece indicar una inhibición por sustrato, no parece influir en la relación entre los porcentajes de residuo no solubilizado, proteína solubilizada, colágeno no hidrolizado y lípidos recuperados con la concentración inicial de sustrato proteico (tablas IIC.6-IIC.9 del Anexo II) o con el grado de hidrólisis alcanzado (figuras 5.16-5.19).

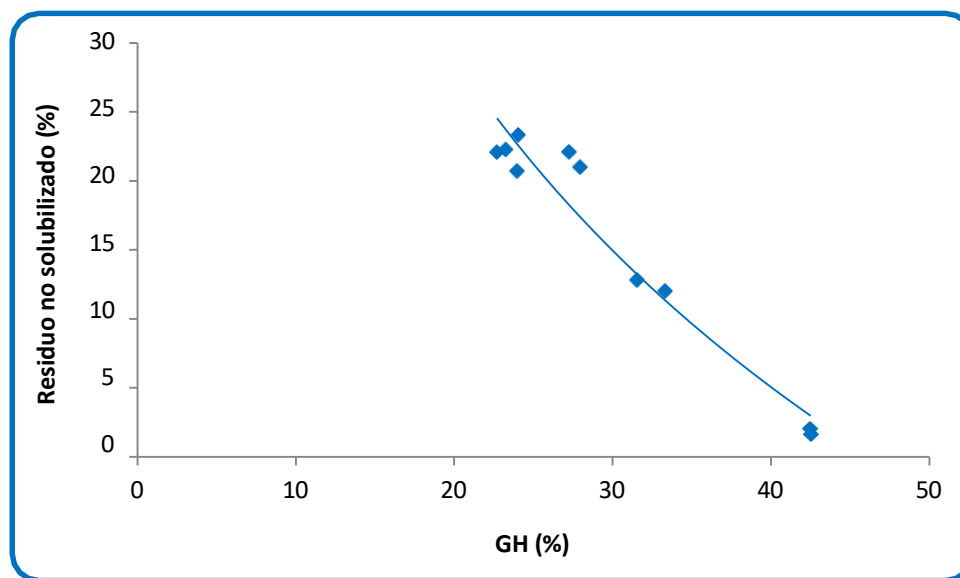


Figura 5.16.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato proteico en el porcentaje de residuo no solubilizado

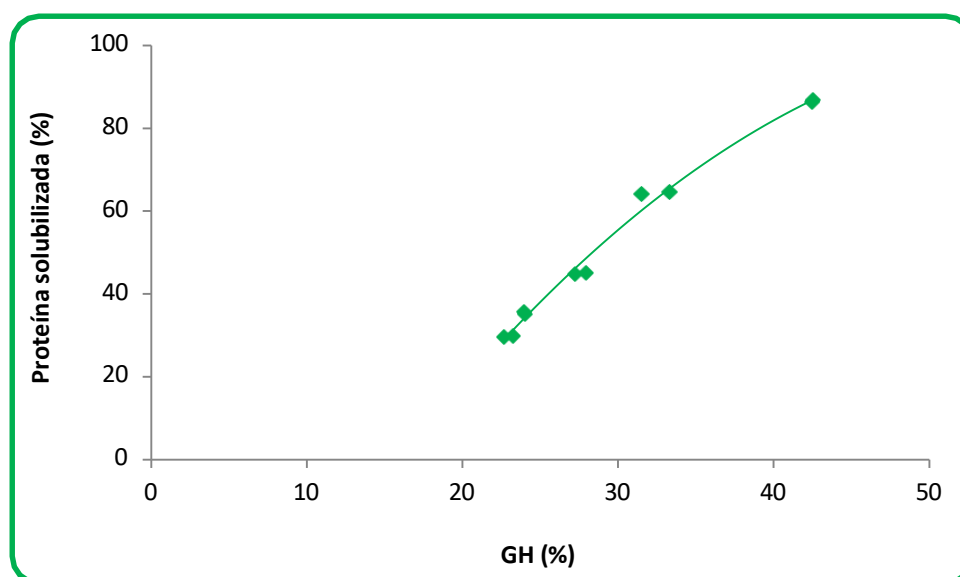


Figura 5.17.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato proteico en el porcentaje de proteína solubilizada

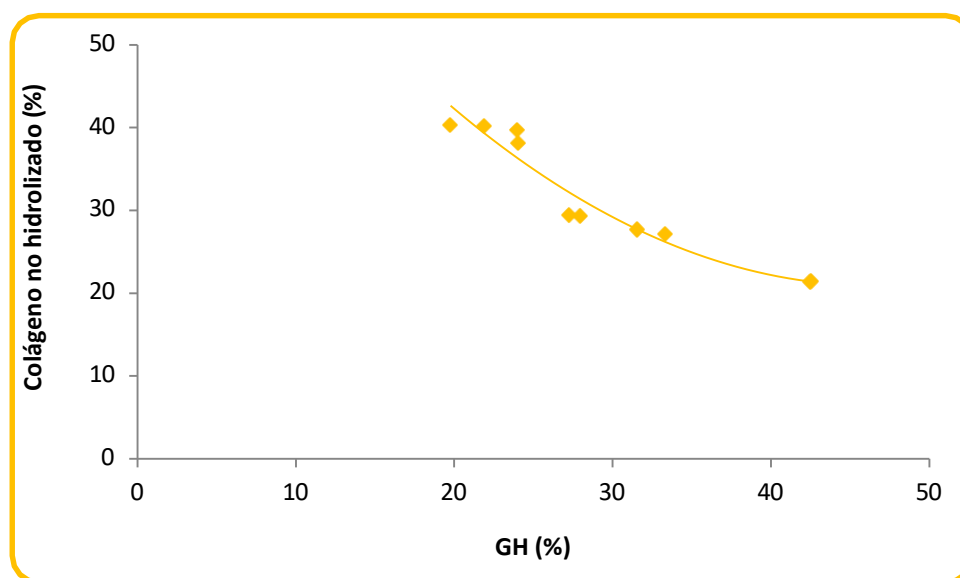


Figura 5.18.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato proteico en el porcentaje de colágeno no hidrolizado

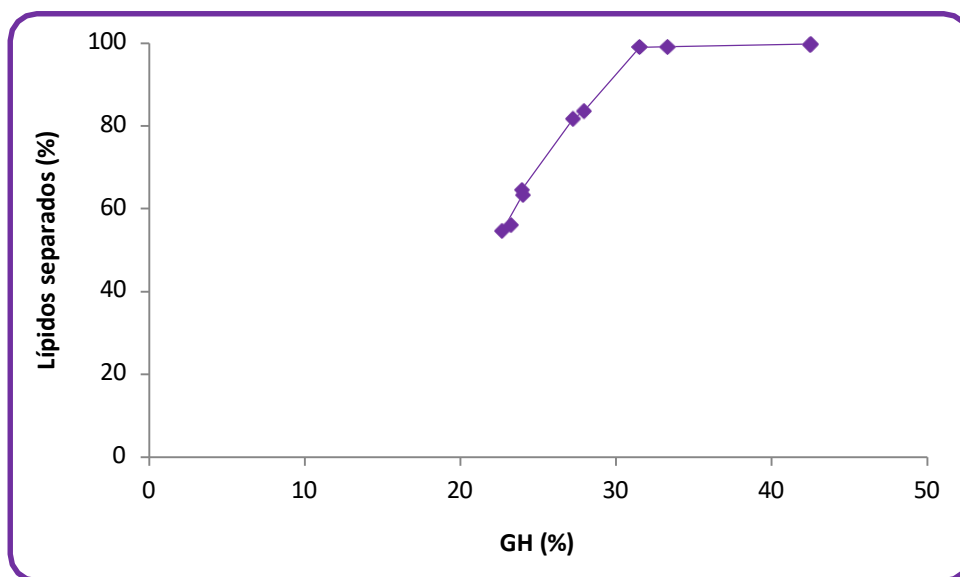


Figura 5.19.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato proteico en el porcentaje de lípidos recuperados

La justificación del comportamiento inesperado de la disminución del grado de hidrólisis con el aumento de la concentración inicial de sustrato tiene pues que deberse al hecho de que la concentración de Alcalase ha permanecido constante durante estos experimentos siendo insuficiente para determinadas concentraciones de sustrato debido al proceso de inhibición lo que indica, claramente, que el factor determinante en el proceso no es la concentración de sustrato sino la relación entre la concentración de proteasa y la concentración de sustrato proteico (E_0/S_0).

Como el parámetro determinante del proceso es pues la relación entre la concentración inicial de enzima y la de sustrato, el análisis del perfil de ácidos grasos que contienen los lípidos extraídos con las distintas concentraciones de sustrato ensayadas (tabla IIC.10 del Anexo II) se comentará en el apartado 5.2.4.

5.2.4. Influencia de la relación concentración inicial de proteasa / concentración inicial de sustrato proteico

Al igual que en los apartados anteriores, la proteasa seleccionada para hacer el estudio de la influencia de la relación entre la concentración inicial de enzima y la concentración inicial de sustrato proteico en el proceso (E_0/S_0) ha sido la Alcalase 2.4L. Las condiciones de operación de pH, temperatura y tiempo de hidrólisis han sido las mismas que en los apartados anteriores: pH = 8, T = 50°C y t = 240 min.

Con el fin de comprobar si, efectivamente, la relación E_0/S_0 era un parámetro determinante de la hidrólisis se comparó el grado de hidrólisis obtenido para distintas concentraciones de Alcalase y diferentes concentraciones de sustrato, pero de modo que la relación E_0/S_0 fuera la misma. Los resultados obtenidos indican que, para relaciones E_0/S_0 iguales, se alcanza el mismo grado de hidrólisis independientemente de los valores de E_0 y S_0 (figura 5.20) lo que confirma que el proceso es dependiente de esa relación. Otros investigadores como Yang et al. (2015) también consideraron la relación E_0/S_0 un factor clave importante en la hidrólisis, en su caso, de residuos de jurel.

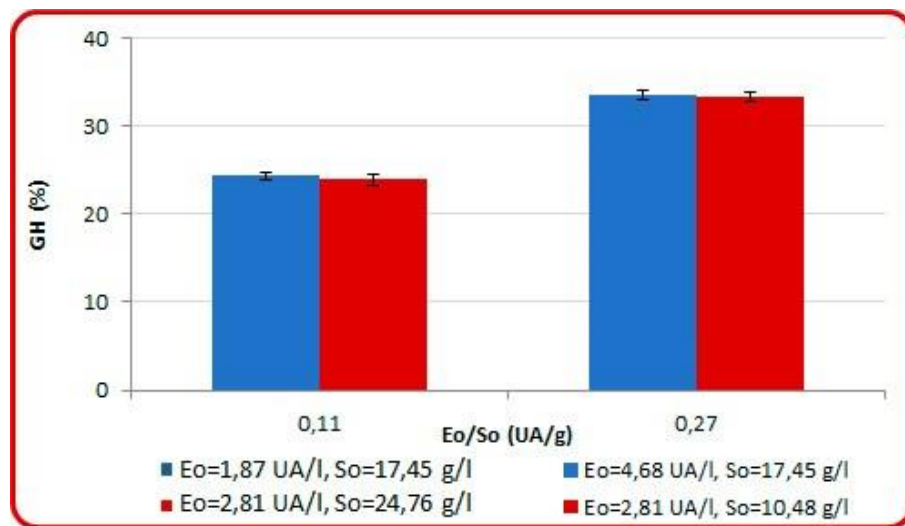


Figura 5.20.- Dependencia del grado de hidrólisis (GH) de la relación entre la concentración de Alcalase y la concentración de sustrato proteico (E_0/S_0)

Una vez hecha la comprobación, se realizaron experimentos en los que se modificó la relación Eo/So en un intervalo de valores entre 0,05 y 0,81 UA/g.

Para determinar la influencia de la relación Eo/So en la hidrólisis enzimática se realizó el seguimiento del grado de hidrólisis (GH) con el tiempo determinando, para un tiempo de 4 horas, el GH máximo alcanzado y las cantidades de sólido no solubilizado, proteína solubilizada, colágeno en fase sólida, lípidos recuperados y perfil de ácidos grasos.

Los resultados obtenidos (tablas IID.1-IID.7 del Anexo II) indican un claro incremento del grado de hidrólisis al aumentar Eo/So que refleja mayor ruptura de enlaces peptídicos cuanto mayor es la cantidad relativa de enzima en relación con la de sustrato que genera un mayor número de puntos activos enlazados entre la Alcalase y la fracción proteica del residuo cárnico (figuras 5.21 y 5.22).

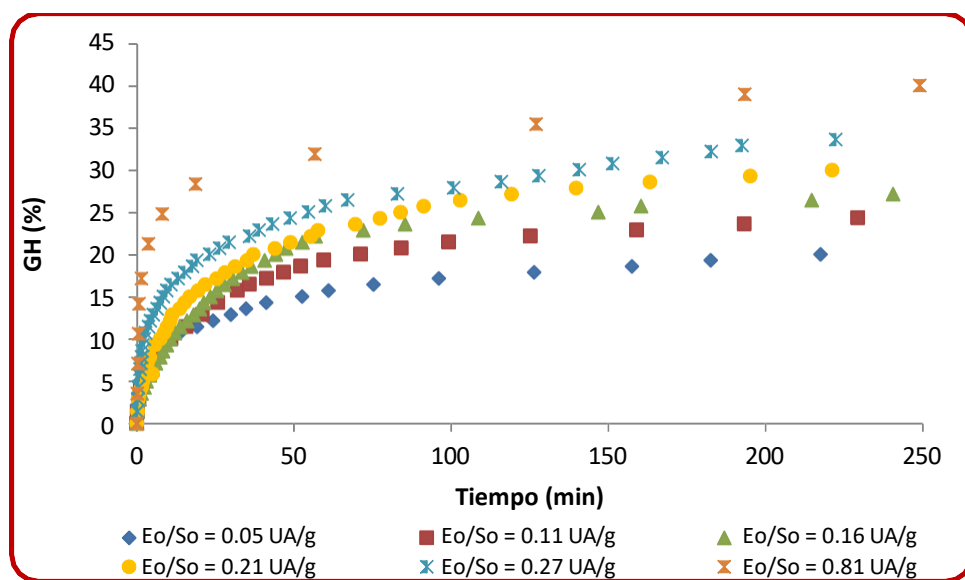


Figura 5.21.- Influencia de la relación entre concentración inicial de Alcalase y la concentración inicial de sustrato proteico (Eo/So) en el grado de hidrólisis (GH)

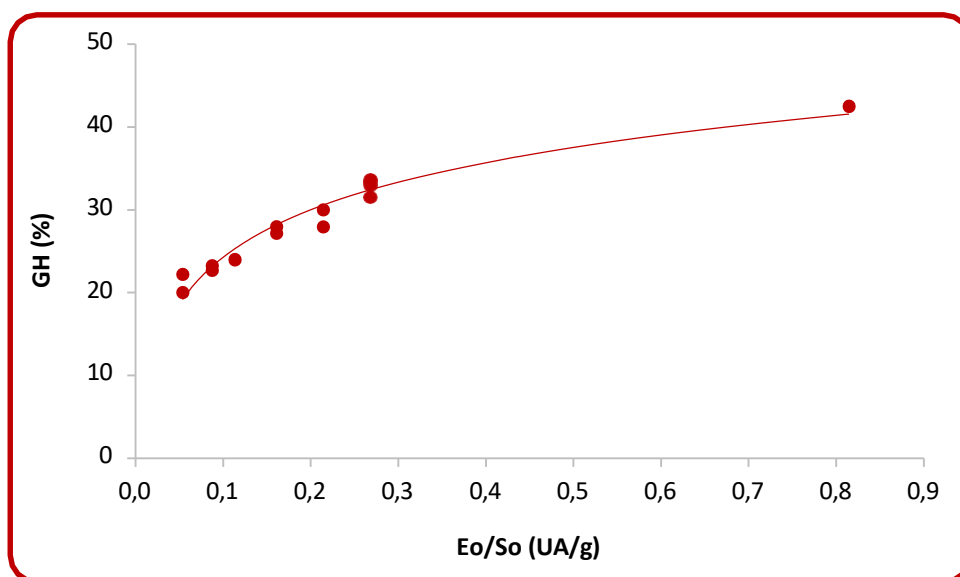


Figura 5.22.- Relación entre Eo/So y el grado de hidrólisis (GH)

Asimismo, se aprecia una relación directa entre Eo/So o el GH con la proteína solubilizada y la cantidad de lípidos recuperados e inversa con la cantidad de sólido no solubilizado y la cantidad de colágeno recuperada (tablas IID.8-IID.11 del Anexo II y figuras 5.23-5.26) cuya explicación es análoga a la indicada en el apartado 5.2.1.

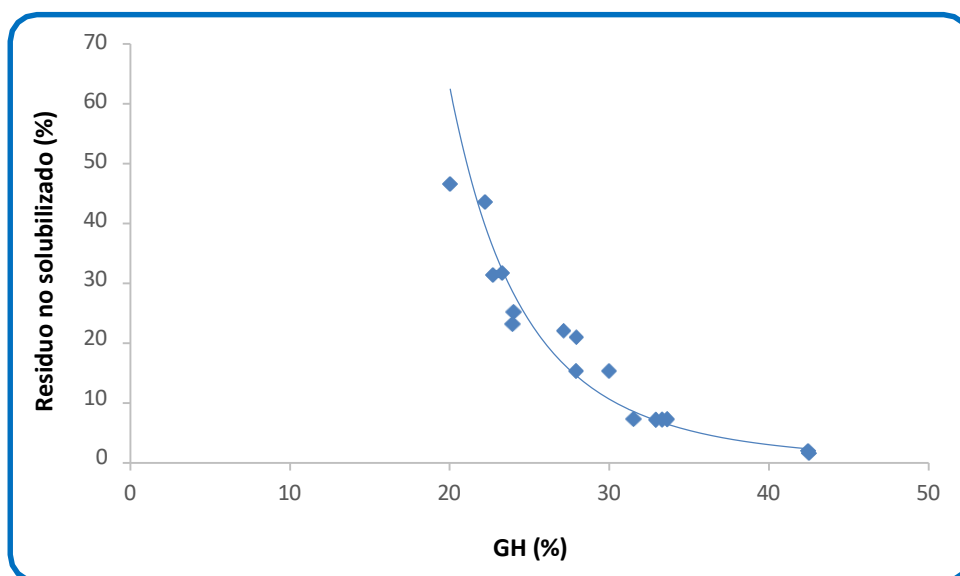


Figura 5.23.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas relaciones Eo/So en el porcentaje de residuo no solubilizado

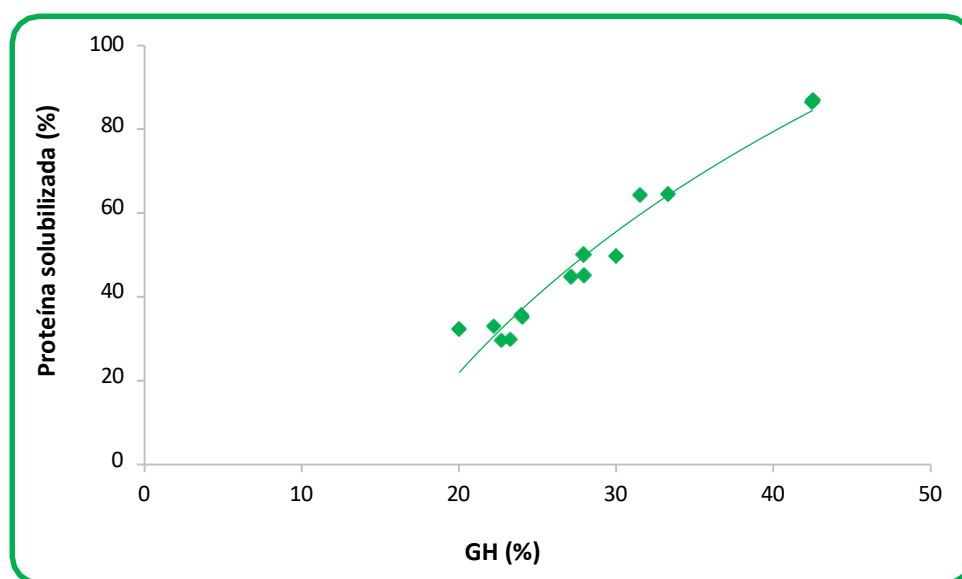


Figura 5.24.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas relaciones Eo/So en el porcentaje de proteína solubilizada

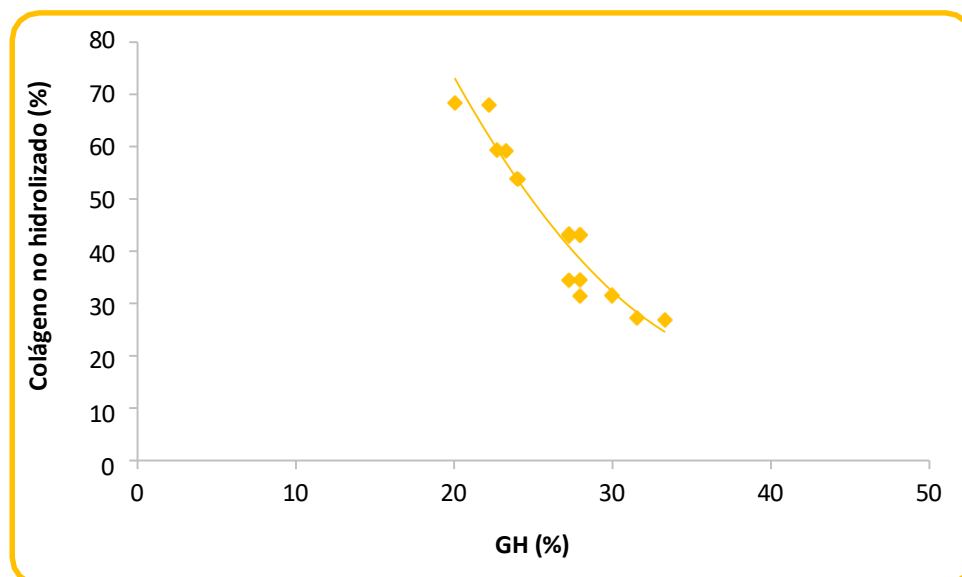


Figura 5.25.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas relaciones Eo/So en el porcentaje de colágeno no hidrolizado

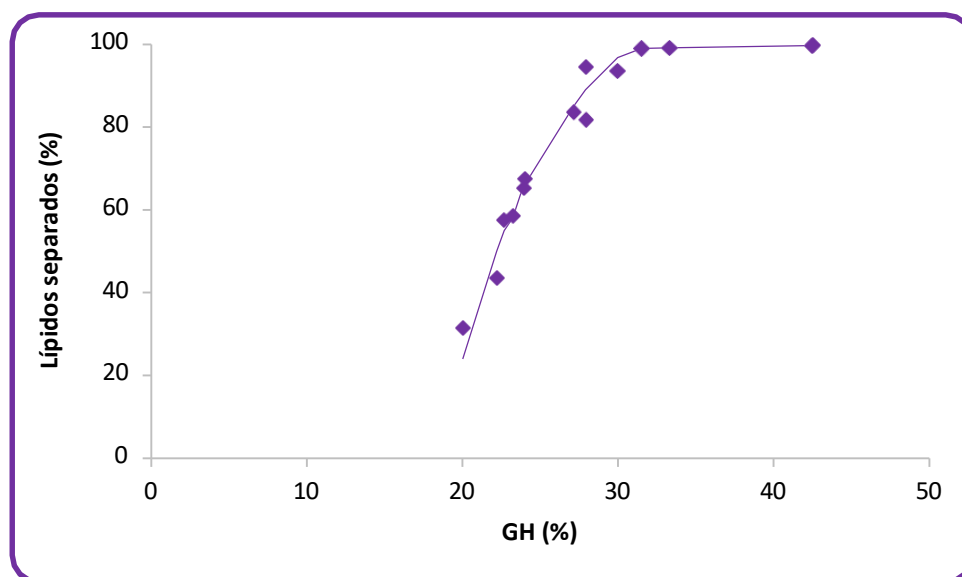


Figura 5.26.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas relaciones Eo/So en el porcentaje de lípidos recuperados

Todo ello indica que, con la finalidad de recuperar colágeno, es adecuado trabajar con relaciones Eo/So bajas (GH bajos) mientras que, para recuperar lípidos u obtener hidrolizados, sería conveniente trabajar con relaciones más elevadas. La selección de la relación Eo/So en ese caso dependerá del tamaño de péptidos que se desee obtener en los hidrolizados ya que, para relaciones superiores a 0,27 UA/g el porcentaje de lípidos recuperados es prácticamente el 100 %.

El tamaño medio de los péptidos obtenidos después de la hidrólisis se puede determinar teniendo en cuenta que existe una relación entre la longitud media de la cadena peptídica y el grado de hidrólisis que viene dada por la siguiente expresión (Kristinsson y Rasco, 2000):

$$LCP = \frac{100}{GH} \quad \text{Ec. 5.3}$$

donde LCP es la longitud media de la cadena peptídica y GH es el grado de hidrólisis expresado en tanto por ciento.

Conocida la longitud media de la cadena peptídica se puede determinar la masa molar media (MM) de los péptidos obtenidos (Adler-Nissen, 1986):

$$MM = 130 \text{ LCP} \qquad \text{Ec. 5.4}$$

En la tabla 5.7 se pueden observar ambos parámetros (longitud media de la cadena peptídica y masa molar media) calculados a partir del grado de hidrólisis para los hidrolizados obtenidos con cada relación Eo/So.

Tabla 5.7.- Longitud media de cadena peptídica y masa molar media de los hidrolizados obtenidos para las diferentes relaciones de concentración de enzima/concentración de sustrato proteico (Eo/So) ensayadas

Eo/So (UA/g)	Longitud media de cadena peptídica	Masa molar media (Daltons)
0,05	4,74	615,68
0,09	4,35	566,08
0,11	4,17	542,34
0,16	3,63	471,95
0,21	3,45	449,05
0,27	3,08	401,05
0,81	2,35	305,99

Para poder utilizar estos hidrolizados proteicos en la industria alimentaria es preciso que tengan fácil digestibilidad y gusto agradable, lo que solo se consigue cuando la masa molar de los péptidos que los componen está dentro de un intervalo determinado. Por ello hay que tener en cuenta que (Camacho *et al.*, 1997):

- Los péptidos de elevada masa molar (superior a 6000 Daltons) pueden producir alergias.
- Los péptidos de masa molar comprendida entre 1000 y 6000 Daltons son amargos.
- Los aminoácidos libres (masa molar inferior a 200 Daltons) son hiperosmóticos y producen diarrea.

Por tanto, la distribución de masas moleculares debe ser lo más estrecha posible, con un alto contenido en di y tripéptidos y masa molar media del orden de 500 Daltons (entre 200 y 1000 Daltons) ya que, de esta forma, desaparecen los problemas de amargor, hiperosmotividad y no son alergénicos (Guadix *et al.*, 2000).

Teniendo eso en cuenta, los hidrolizados de mejor calidad serían los obtenidos para relaciones de concentraciones proteasa/sustrato proteico entre 0,11 y 0,16 UA/g ya que, con esa relación, la masa molar media del producto final es próxima a 500 Daltons.

En la tabla 5.8 se puede observar la distribución de ácidos grasos que contienen los lípidos extraídos con las distintas relaciones Eo/So ensayadas (tabla IID.12 del anexo II). Como se puede comprobar, no hay cambio significativo en el perfil de ácidos grasos respecto a la composición de la grasa del residuo previa a la hidrólisis (tabla 5.2) manteniéndose igual la distribución de ácidos grasos. Se confirma pues que la hidrólisis con proteasas parece ser un medio efectivo para la recuperación de los lípidos sin afectar su calidad tal y como también comprobaron Hathwar *et al.* (2011) en estudios realizados con residuos de pescado.

Tabla 5.8.- Distribución de ácidos grasos (%) en los lípidos recuperados para distintas relaciones proteasa/sustrato proteico (Eo/So)

Ácido graso	Eo/So (UA/g)						
	0,05	0,09	0,11	0,16	0,21	0,27	0,81
C14:0	4,26±0,09	4,52±0,09	4,32±0,09	4,23±0,04	4,28±0,09	4,23±0,08	4,41±0,10
C14:1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
C15:0	0,29±0,01	0,59±0,01	0,19±0,01	0,22±0,00	0,24±0,01	0,23±0,01	0,19±0,01
C15:1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
C16:0	25,40±0,48	25,16±0,52	25,19±0,52	25,36±0,28	25,45±0,49	25,35±0,49	25,19±0,42
C16:1	0,29±0,03	0,48±0,01	0,28±0,01	0,20±0,01	0,51±0,01	0,55±0,01	0,18±0,01
C17:0	3,20±0,07	3,86±0,08	3,24±0,06	3,57±0,04	3,09±0,06	3,49±0,07	3,55±0,08
C17:1	0,52±0,01	0,61±0,01	0,51±0,01	0,33±0,01	0,50±0,01	0,53±0,01	0,30±0,01
C18:0	12,67±0,24	12,73±0,25	12,70±0,23	12,98±0,17	12,75±0,30	12,62±0,11	12,96±0,27
C18:1n9c+t	24,49±0,41	22,31±0,51	24,79±0,19	24,55±0,24	24,61±0,44	24,50±0,42	24,52±0,43
C18:2n6c+t	10,78±0,34	10,93±0,22	10,82±0,25	10,63±0,21	10,73±0,27	10,50±0,21	10,99±0,17
C18:3n6	3,03±0,04	3,10±0,07	3,03±0,04	3,07±0,07	3,04±0,05	3,14±0,05	3,05±0,07
C18:3n3	0,39±0,01	0,44±0,01	0,38±0,01	0,23±0,00	0,35±0,01	0,23±0,00	0,14±0,01
C20:0	0,42±0,01	0,62±0,01	0,40±0,01	0,34±0,01	0,51±0,01	0,28±0,02	0,31±0,01
C20:1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
C20:2	1,71±0,04	1,95±0,05	1,66±0,04	1,81±0,06	1,81±0,04	1,69±0,04	1,79±0,04
C20:3n3	4,82±0,08	4,95±0,10	4,73±0,08	4,83±0,11	4,62±0,08	4,84±0,10	4,81±0,09
C20:3n6+c21:0	3,93±0,10	3,71±0,08	3,83±0,08	3,89±0,08	3,73±0,07	3,92±0,08	3,87±0,08
C20:4n6	3,80±0,08	3,38±0,07	3,93±0,08	3,76±0,08	3,78±0,08	3,90±0,09	3,74±0,08
AGS	46,24±0,53	48,14±0,59	46,04±0,57	46,70±0,47	46,32±0,61	46,20±0,42	46,61±0,48
AGI	53,76±0,34	51,86±0,57	53,96±0,41	53,30±0,74	53,68±0,16	53,80±0,10	53,39±0,06

AGS: Ácidos grasos saturados

AGI: Ácidos grasos insaturados

5.2.5. Influencia del pH y la temperatura en la hidrólisis proteica

También en este caso, la proteasa seleccionada para hacer el estudio de la influencia del pH y la temperatura en el proceso ha sido la Alcalase 2.4L. La duración de las hidrólisis se ha mantenido en 240 min y se han utilizado como concentraciones iniciales de proteasa y sustrato proteico en el reactor los valores medios empleados en los estudios anteriores: 2,84 UA/l y 17,45 g/l, respectivamente.

Los intervalos de pH y temperatura ensayados están en torno a los valores utilizados anteriormente: intervalo de pH = 7,0-9,0 (para una temperatura de 50°C) e intervalo de temperatura T = 40-60°C (para un pH de 8,0).

Para determinar la influencia del pH y la temperatura en la hidrólisis enzimática se realizó el seguimiento del grado de hidrólisis (GH) con el tiempo determinando, para un tiempo de 4 horas, el GH máximo alcanzado y las cantidades de sólido no solubilizado, proteína solubilizada, colágeno en fase sólida, lípidos recuperados y el perfil de ácidos grasos.

La figura 5.27 muestra la evolución del grado de hidrólisis con el tiempo para distintos pH (tablas IIE.1-IIE.5 del Anexo II). Se puede apreciar que el GH más alto se obtiene a pH = 9,0 reduciéndose su valor a medida que disminuye el pH de modo que, para el pH más bajo ensayado (7,0), el valor del grado de hidrólisis es del orden de 15 unidades más bajo que a pH 9,0. Experimentos realizados a pH superiores a 9,0 mostraron una clara disminución del GH observándose que, para valores de 10, la reacción prácticamente no tenía lugar.

A su vez, la figura 5.28 muestra la evolución del grado de hidrólisis con el tiempo para distintas temperaturas (tablas IIF.1-IIF.5 del Anexo II), apreciándose una disminución del grado de hidrólisis superior a 10 unidades al aumentar la temperatura 20°C. También se observó disminución en el grado de hidrólisis a temperaturas inferiores a 40°C comprobándose que, para valores de 35°C, la reacción no se producía.

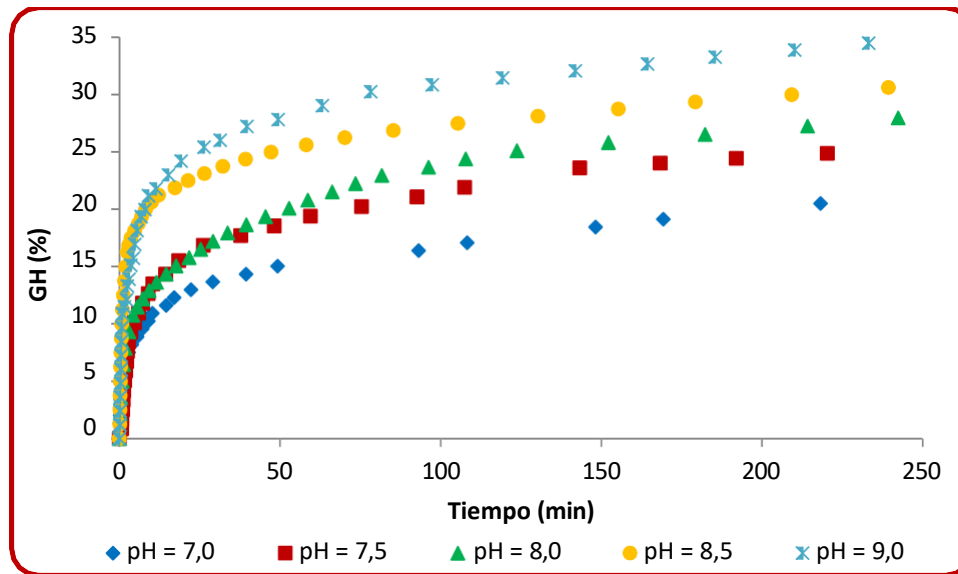


Figura 5.27.- Influencia del pH en el grado de hidrólisis alcanzado con Alcalase (GH)

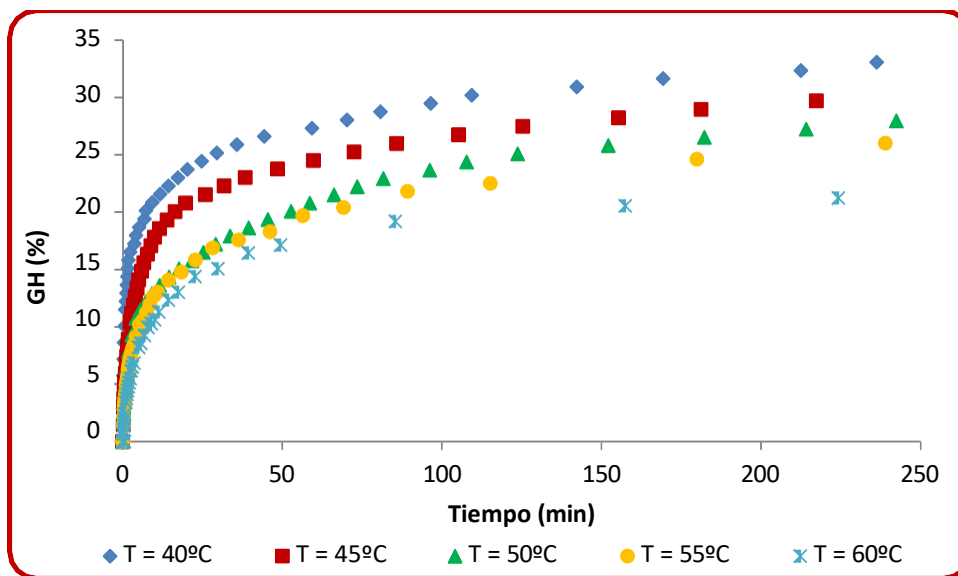


Figura 5.28.- Influencia de la temperatura en el grado de hidrólisis alcanzado con Alcalase (GH)

Los resultados obtenidos para los parámetros analizados muestran cómo los pHs elevados y las temperaturas bajas favorecen la hidrólisis produciendo hidrolizados con mayor grado de hidrólisis y más cantidad de proteína solubilizada y permitiendo la recuperación de mayor cantidad de lípidos (tablas 5.9 y 5.10).

Tabla 5.9.- Relación entre los parámetros determinados y el pH en la hidrólisis con Alcalase

pH	GH (%)	Residuo no solubilizado¹ (%)	Proteína solubilizada² (%)	Colágeno no hidrolizado³ (%)	Lípidos recuperados⁴ (%)
7,0	21,09±0,11	25,19±0,35	40,30±0,14	48,18±0,71	70,73±1,76
7,5	25,67±0,59	22,99±1,19	41,05±0,11	45,41±0,94	74,87±0,21
8,0	27,55±0,56	21,53±0,75	45,03±0,20	43,10±0,10	82,62±1,23
8,5	29,95±0,88	17,41±0,10	58,65±0,38	42,18±0,45	86,54±1,61
9,0	35,45±0,54	14,42±0,03	59,30±0,62	38,18±0,44	89,57±0,38

¹Tabla IIE.6 del Anexo II, ²Tabla IIE.7 del Anexo II, ³Tabla IIE.8 del Anexo II, ⁴Tabla IIE.9 del Anexo II

Tabla 5.10.- Relación entre los parámetros determinados y la temperatura (T) en la hidrólisis con Alcalase

T (°C)	GH (%)	Residuo no solubilizado¹ (%)	Proteína solubilizada² (%)	Colágeno no hidrolizado³ (%)	Lípidos recuperados⁴ (%)
40	33,76±1,00	11,26±0,06	46,76±0,20	35,94±0,70	97,56±3,00
45	30,79±0,52	14,93±0,04	45,82±0,27	39,23±0,08	87,12±3,17
50	27,55±0,56	21,53±0,75	45,03±0,20	43,10±0,10	82,62±1,23
55	25,94±0,07	22,69±0,01	41,62±0,38	43,17±0,34	82,05±2,55
60	22,16±0,74	25,60±0,20	40,83±0,62	47,47±0,73	68,86±3,06

¹Tabla IIF.6 del Anexo II, ²Tabla IIF.7 del Anexo II, ³Tabla IIF.8 del Anexo II, ⁴Tabla IIF.9 del Anexo II

El comportamiento frente al pH está justificado por el aumento de la actividad enzimática con este parámetro (figura 5.29) y la estabilidad de la enzima en el intervalo de pH 7-10 (figura 5.30), y aunque el comportamiento frente a la temperatura podría parecer que contradice la bibliografía que indica que un aumento de temperatura corresponde a una mayor actividad enzimática (figura 5.31), lo cierto es que, como se indicó en el apartado 5.2.2, la desactivación que se produce con el tiempo al aumentar la temperatura (figura 5.7) es tan elevada que la eficacia del proceso es mayor a 40°C dado el tiempo que se mantiene la reacción.

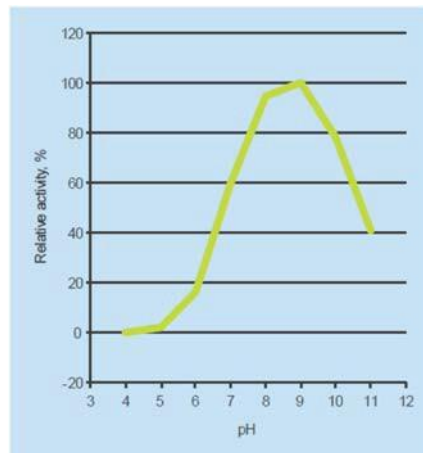


Figura 5.29.- Actividad de Alcalase con el pH (Novozymes, 2008)

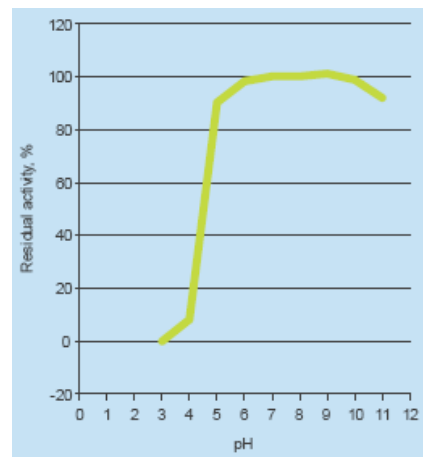


Figura 5.30.- Estabilidad de Alcalase con el pH (Novozymes, 2008)

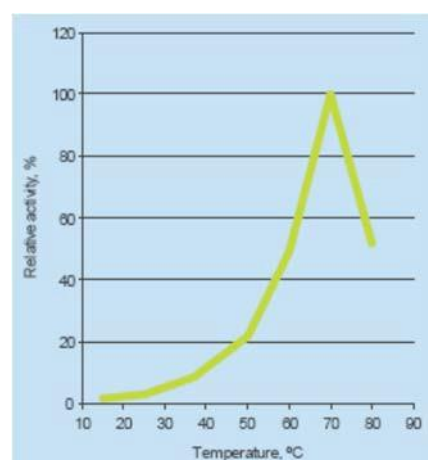


Figura 5.31.- Actividad de la Alcalase con la temperatura (Novozymes, 2008)

De acuerdo con los resultados obtenidos, con la finalidad de recuperar colágeno, es adecuado trabajar con pHs más bajos o temperaturas más altas mientras que, para recuperar lípidos u obtener hidrolizados, sería conveniente trabajar con pHs más altos o temperaturas más bajas. Por otra parte, la selección de las condiciones de operación de pH y temperatura dependerá del tamaño de péptidos que se desee obtener en los hidrolizados.

En la tabla 5.11 se puede observar la longitud media de la cadena peptídica y la masa molar media calculadas a partir del grado de hidrólisis (ec. 5.3 y 5.4) para los hidrolizados obtenidos para las distintas condiciones de operación. De acuerdo con lo comentado en el apartado anterior, la masa molar media recomendada para utilizar los hidrolizados en industrias alimentarias debe estar en torno a 500 Daltons (Camacho *et al.*, 1997; Guadix *et al.*, 2000) por lo que las condiciones de operación más adecuadas estarían entre 7,5 y 8,0 de pH y 50 y 55°C de temperatura.

Tabla 5.11.- Longitud media de cadena peptídica y masa molar media de los hidrolizados obtenidos para los diferentes pHs y temperaturas (T) ensayados

pH	T (°C)	Longitud media de cadena peptídica	Masa molar media (Daltons)
7.0	50	4,74	616,55
7.5	50	3,90	506,43
8.0	50	3,63	471,95
8.5	50	3,34	434,13
9.0	50	2,82	366,77
8.0	40	2,96	385,13
8.0	45	3,25	422,28
8.0	50	3,63	471,95
8.0	55	3,86	501,16
8.0	60	4,51	586,77

En las tablas 5.12 y 5.13 se puede observar la distribución de ácidos grasos que contienen los lípidos extraídos con los distintos pHs y temperaturas ensayadas (tablas IIE.10 y IIF.10 del Anexo II). Una vez más se comprueba que la hidrólisis con proteasas no afecta la distribución de ácidos grasos en esos lípidos de modo que se mantiene el mismo perfil de ácidos que en el residuo cárnico sin hidrolizar (tabla 5.2).

Tabla 5.12.- Distribución de ácidos grasos (%) en los lípidos recuperados con Alcalase para distintos pHs

Ácido graso	pH				
	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
C14:0	4,14±0,08	4,10±0,08	4,31±0,10	4,27±0,08	4,18±0,09
C14:1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
C15:0	0,44±0,01	0,42±0,01	0,39±0,01	0,27±0,01	0,18±0,01
C15:1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
C16:0	25,47±0,53	25,76±0,49	25,38±0,52	25,78±0,54	25,79±0,52
C16:1	0,31±0,01	0,25±0,01	0,28±0,01	0,16±0,01	0,21±0,01
C17:0	3,96±0,08	3,76±0,08	3,41±0,04	3,76±0,08	3,84±0,08
C17:1	0,29±0,01	0,41±0,01	0,49±0,02	0,44±0,01	0,34±0,01
C18:0	12,62±0,23	13,08±0,18	12,48±0,31	12,75±0,28	13,16±0,30
C18:1n9c+t	24,10±0,55	24,37±0,50	24,72±0,61	24,84±0,48	24,29±0,41
C18:2n6c+t	10,14±0,21	10,27±0,25	10,83±0,25	10,44±0,23	10,42±0,21
C18:3n3	0,42±0,01	0,40±0,01	0,31±0,03	0,21±0,01	0,35±0,01
C18:3n6	3,06±0,06	3,06±0,06	2,81±0,06	3,23±0,06	3,14±0,06
C20:0	0,47±0,01	0,42±0,01	0,51±0,01	0,31±0,01	0,39±0,01
C20:1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
C20:2	2,17±0,05	1,93±0,04	1,98±0,04	1,80±0,04	1,72±0,05
C20:3n3	4,82±0,11	4,61±0,09	4,83±0,17	4,45±0,10	4,53±0,09
C20:3n6+c21:0	3,89±0,09	3,35±0,08	3,56±0,06	3,52±0,06	3,43±0,08
C20:4n6	3,70±0,09	3,81±0,08	3,53±0,07	3,70±0,08	3,96±0,08
AGS	47,10±0,60	47,54±0,53	46,48±0,46	47,21±0,08	47,61±0,21
AGI	52,90±0,56	52,46±0,43	53,51±0,63	52,79±0,08	52,39±0,30

AGS: Ácidos grasos saturados

AGI: Ácidos grasos insaturados

Tabla 5.13.- Distribución de ácidos grasos (%) en los lípidos recuperados con Alcalase para distintas temperaturas

Ácido graso	Temperatura (°C)				
	40	45	50	55	60
C14:0	4,19±0,08	4,24±0,09	4,31±0,10	4,33±0,09	4,25±0,09
C14:1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
C15:0	0,30±0,01	0,20±0,01	0,39±0,01	0,29±0,01	0,27±0,01
C15:1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
C16:0	25,35±0,57	25,77±0,52	25,38±0,52	25,26±0,52	25,55±0,53
C16:1	0,31±0,01	0,29±0,01	0,28±0,01	0,22±0,01	0,28±0,01
C17:0	3,51±0,08	3,90±0,08	3,41±0,04	3,93±0,08	3,91±0,08
C17:1	0,43±0,01	0,36±0,01	0,49±0,02	0,35±0,01	0,42±0,01
C18:0	13,17±0,29	12,72±0,25	12,48±0,31	13,08±0,25	13,07±0,26
C18:1n9c+t	24,99±0,58	24,91±0,49	24,72±0,61	24,64±0,49	24,36±0,50
C18:2n6c+t	10,19±0,21	10,40±0,23	10,83±0,25	10,44±0,22	10,42±0,21
C18:3n3	0,29±0,01	0,24±0,01	0,31±0,03	0,23±0,01	0,26±0,01
C18:3n6	3,15±0,06	3,20±0,06	2,81±0,06	3,23±0,06	3,21±0,06
C20:0	0,34±0,01	0,42±0,01	0,51±0,01	0,39±0,01	0,30±0,01
C20:1	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
C20:2	1,72±0,04	1,97±0,04	1,98±0,04	1,80±0,04	1,95±0,04
C20:3n3	4,87±0,11	4,92±0,10	4,83±0,17	4,95±0,11	4,93±0,11
C20:3n6+c21:0	3,27±0,07	3,32±0,07	3,56±0,06	3,52±0,08	3,50±0,06
C20:4n6	3,92±0,08	3,14±0,06	3,53±0,07	3,34±0,08	3,32±0,06
AGS	46,86±0,84	47,25±0,08	46,48±0,46	47,28±0,10	47,35±0,12
AGI	53,14±0,71	52,75±0,04	53,51±0,63	52,72±0,18	52,65±0,06

AGS: Ácidos grasos saturados

AGI: Ácidos grasos insaturados

5.2.6. Cinética de la hidrólisis con proteasas

El estudio cinético de la hidrólisis con Alcalase se divide en varias partes: la determinación de la ecuación cinética con los parámetros correspondientes, la determinación de los fenómenos que justifican la forma de las curvas de hidrólisis, la determinación del mecanismo de la reacción de hidrólisis de proteína a partir de los dos estudios anteriores y la determinación de las constantes y las energías de activación y desactivación del proceso.

5.2.6.1. Ecuación cinética que describe el proceso de hidrólisis con Alcalase

Con el fin de determinar la ecuación cinética que define el proceso, y comprobada en los apartados anteriores la clara relación existente entre el grado de hidrólisis y el porcentaje de productos recuperados, se optó por seguir la cinética del proceso a través del grado de hidrólisis para lo que se determinó la variación del mismo con el tiempo para distintas concentraciones de proteasa (tablas IIB.1-IIB.5 del Anexo II), de sustrato proteico (tablas IIC.1-IIC.5 del Anexo II), de pH (tablas IIE.1-IIE.5 del Anexo II) y de temperatura (tablas IIF.1-IIF.5 del Anexo II).

Las curvas obtenidas se ajustaron por regresión no lineal comprobándose que la variación del grado de hidrólisis con el tiempo puede describirse mediante una ecuación empírica exponencial tipo Elovich en la que la variación del grado de hidrólisis con el tiempo es función de dos constantes cinéticas K_1 y K_2 .

$$\frac{dGH}{dt} = K_1 e^{-K_2 GH} \quad \text{Ec.5.5}$$

Para la determinación de los parámetros K_1 y K_2 , se ha utilizado un programa informático comercial, SPSS, que realiza la regresión no lineal mediante el algoritmo de Levenberg-Marquardt. En las tablas 5.14 y 5.15 se incluyen los valores obtenidos.

Tabla 5.14.- Valores de K_1 y K_2 para las diferentes concentraciones iniciales de proteasa y de sustrato proteico ($T = 50\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8,0$)

Eo (UA/l)	So (g/l)	K_1 (min^{-1})	K_2
0,94	17,45	2,88±0,12	0,227±0,001
1.87	17,45	5,99±0,20	0,227±0,001
2.81	17,45	8,66±0,38	0,227±0,001
3.74	17,45	16,49±0,25	0,227±0,001
4.68	17,45	28,82±0,36	0,227±0,001
2.81	3,45	202,63±0,99	0,235±0,001
2.81	10.48	29,99±0,41	0,230±0,001
2.81	17,45	8,66±0,38	0,227±0,001
2.81	24,76	3,86±0,12	0,223±0,001
2.81	32,10	2,79±0,09	0,221±0,001

Tabla 5.15.- Valores de K_1 y K_2 para diferentes valores de pH y temperatura ($S_o = 17,45$ g/l, $E_o = 2.81$ UA/l)

pH	T (°C)	K_1 (min⁻¹)	K_2
7,0	50	2,86±0,05	0,233±0,001
7,5	50	6,51±0,14	0,230±0,001
8,0	50	8,66±0,38	0,227±0,001
8,5	50	21,05±0,55	0,225±0,001
9,0	50	43,71±0,95	0,222±0,001
8,0	40	41,63±0,93	0,232±0,001
8,0	45	19,89±0,41	0,230±0,001
8,0	50	8,66±0,38	0,227±0,001
8,0	55	6,31±0,20	0,225±0,001
8,0	60	3,71±0,12	0,223±0,001

Con los valores así obtenidos y la ecuación 5.5, se han obtenido las líneas que aparecen en las figuras 5.32-5.34 que, como puede apreciarse, se ajustan perfectamente a la tendencia de los datos experimentales representados con puntos.

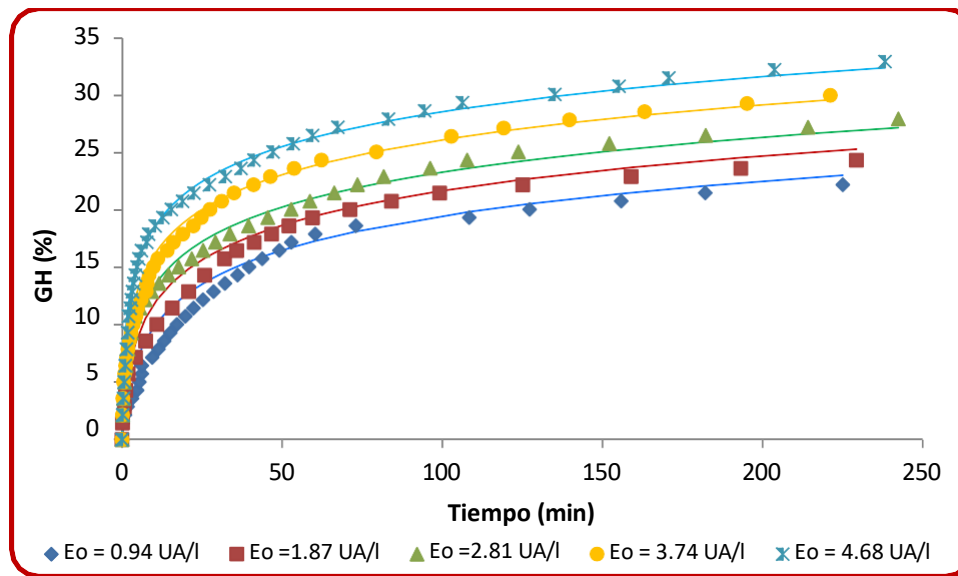


Figura 5.32.- Evolución del grado de hidrólisis (GH) con el tiempo y la concentración de proteasa (E_o) para una concentración sustrato proteico de 17,45 g/l ($T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8,0$)

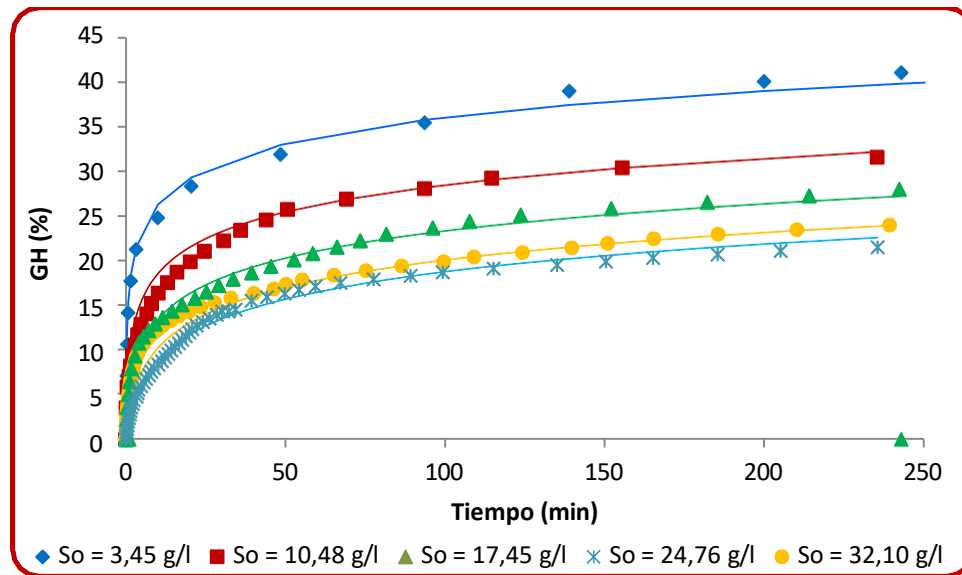


Figura 5.33.- Evolución del grado de hidrólisis (GH) con el tiempo y la concentración de sustrato proteico (S_o) para una concentración de Alcalase de 2,81 UA/l ($T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8,0$)

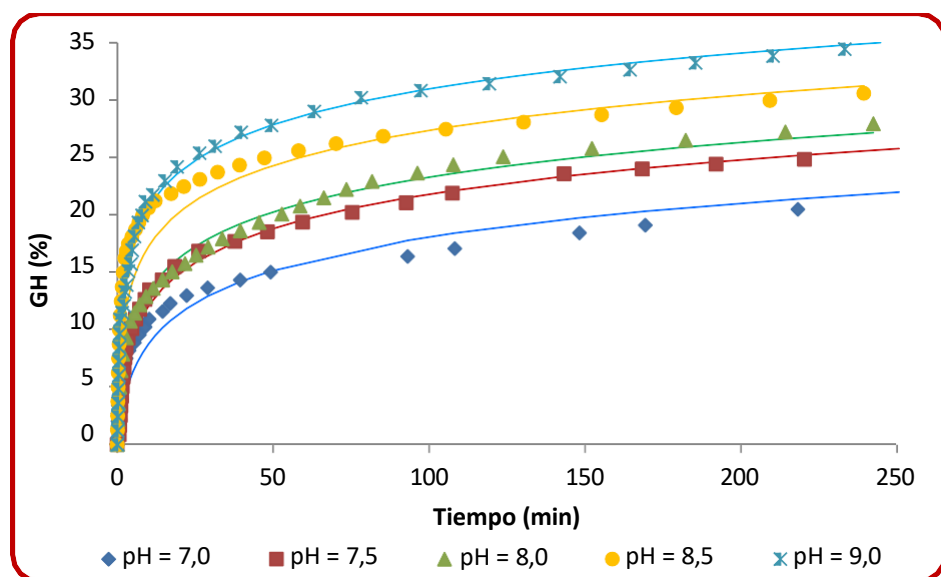


Figura 5.34.- Evolución del grado de hidrólisis (GH) con el tiempo y el pH ($S_o = 17,45$ g/l, $E_o = 2,81$ UA/l ($T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8,0$))

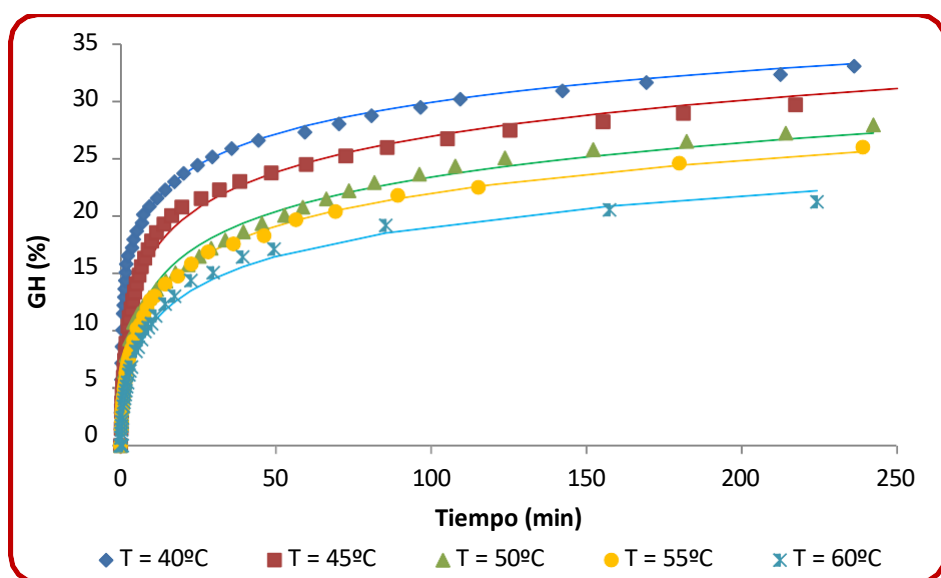


Figura 5.35.- Evolución del grado de hidrólisis (GH) con el tiempo y la temperatura T ($S_o = 17,45$ g/l, $E_o = 2,81$ UA/l, $\text{pH} = 8,0$)

5.2.6.2. Fenómenos justificativos de las curvas de hidrólisis con Alcalase

Las curvas experimentales obtenidas presentan, en todos los casos, una velocidad de reacción inicial muy alta seguida de una notable disminución de la misma con tendencia a un valor límite.

Puesto que los valores de los grados de hidrólisis obtenidos difieren mucho de los que corresponderían a la hidrólisis total de la proteína, la disminución de la velocidad de hidrólisis con el tiempo sólo puede deberse a tres factores:

- Una disminución en la concentración de los enlaces peptídicos disponibles para la hidrólisis.
- Una desactivación de la enzima.
- Una inhibición de la enzima.

A) Disminución de enlaces peptídicos susceptibles de hidrólisis

Con la finalidad de comprobar la existencia o no de enlaces peptídicos susceptibles de ser hidrolizados se añadió a los 60 minutos de hidrólisis, cuando ya la velocidad de hidrólisis había disminuido notablemente, un 25 % de sustrato proteico adicional (tabla AIIG.1 del Anexo II) con lo cual, si éste era el factor limitante del proceso, la velocidad de reacción debería haber aumentado notablemente a partir de ese momento, hecho que como puede verse en la figura 5.36 no se observó.

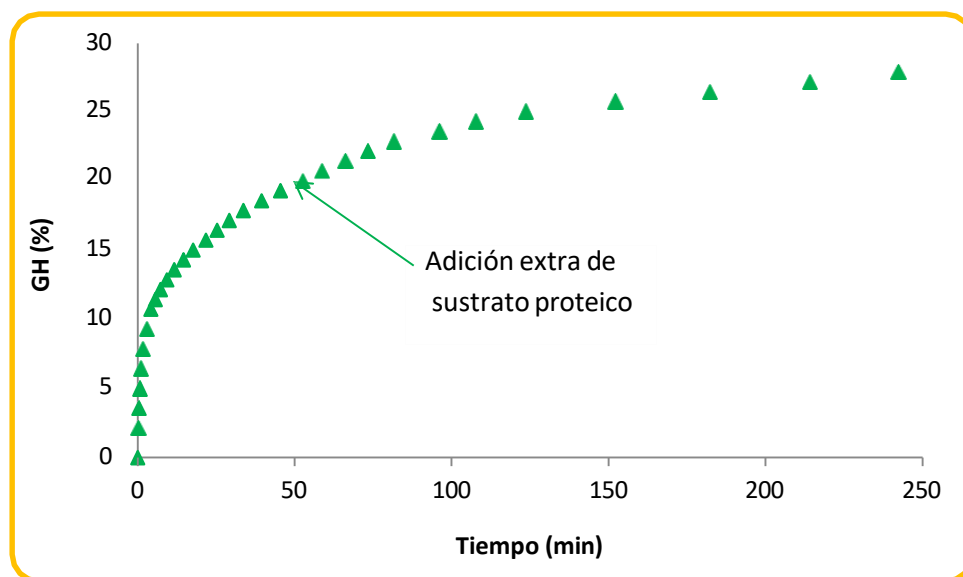


Figura 5.36.- Efecto de la adición de un 25 % extra de sustrato proteico sobre la velocidad de reacción de hidrólisis con Alcalase ($S_0 = 17,45$ g/l, $E_0 = 2,81$ UA/l, $T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8,0$)

Por otra parte, la existencia de este primer factor debería hacer tender todas las curvas en las que se representa el grado de hidrólisis frente al tiempo hacia un límite común determinado por la concentración de enlaces peptídicos susceptibles de ser hidrolizados en el sustrato original, hecho que no se observa en las figuras, lo que parece indicar que éste no es el fenómeno causante de los resultados obtenidos.

B) Desactivación enzimática

Para comprobar la existencia o no de desactivación enzimática, se llevó a cabo otro experimento en el que se añadió a los 60 minutos de hidrólisis, nuevamente cuando ya la velocidad de hidrólisis había disminuido notablemente, una cantidad de enzima igual a la inicialmente puesta en el reactor (tabla AIIIH.1 del Anexo II). En este caso sí que se observó un claro aumento de la velocidad de reacción que volvió a ser análoga a la obtenida al principio del proceso lo que indicaba la desactivación de la enzima (figura 5.37).

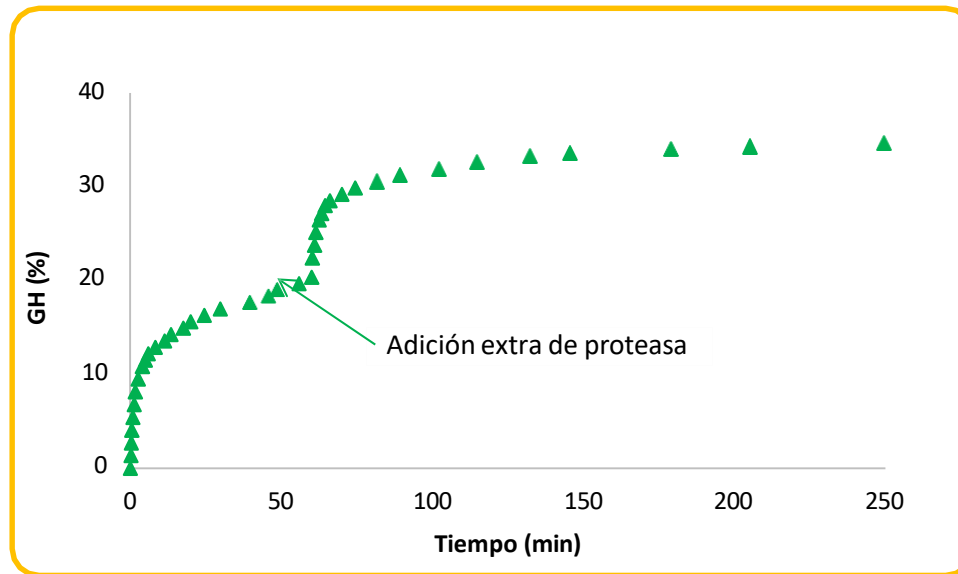


Figura 5.37.- Efecto de la adición de un 100 % extra de proteasa sobre la velocidad de reacción de hidrólisis de sustrato proteico ($S_o = 17,45$ g/l, $E_o = 2,81$ UA/l, $T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8,0$)

La existencia de desactivación enzimática no es extraña ya que existen distintos factores que pueden afectar la estabilidad de la enzima entre los que se incluyen la temperatura, el pH, la fuerza iónica, esfuerzos mecánicos... (Doran, 2013).

Para determinar el tipo de desactivación enzimática se representó el grado de hidrólisis (GH) frente al producto de la concentración de enzima y el tiempo (Eot) correspondiente a los experimentos indicados en las tablas IIB.1-IIB.5 del Anexo II, obteniéndose una única curva para las distintas concentraciones de enzima ensayadas (figura 5.38).

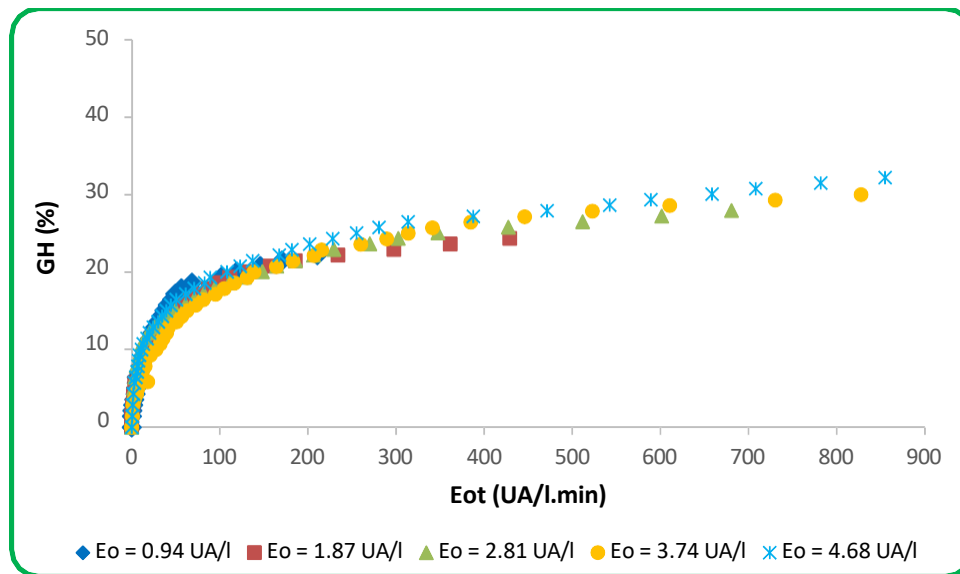


Figura 5.38.- Grado de hidrólisis (GH) frente a Eot (So=17,45 g/l, T=50°C, pH=8,0)

La obtención de una única curva sólo puede deberse a dos circunstancias: a que no exista desactivación enzimática o a que la desactivación enzimática sea de segundo orden (Figuerola et al., 2012). Dado que se ha comprobado que sí que existe desactivación, la única conclusión que puede sacarse es que la desactivación de la enzima es de orden dos.

C) Inhibición enzimática

Para determinar la existencia o no de inhibición enzimática se calculó, para distintas concentraciones iniciales de sustrato que iban de 3 a 35 g/l, la velocidad de hidrólisis de las proteínas (v):

$$v = S_0 \frac{l!x}{l!t} \quad \text{Ec. 5.6}$$

donde $x = \text{GH}/100$.

En la tabla 5.16 aparecen los valores calculados a partir de los datos experimentales de las tablas IIC.1-IIC.5 del Anexo II.

Tabla 5.16.- Evolución de la velocidad de reacción en la hidrólisis de proteínas con Alcalase (Eo = 2,81 UA/l, T = 50°C, pH = 8,0)

So = 3,45 g/l		So = 10,48 g/l		So = 17,45 g/l		So = 24,76 g/l		So = 32,10 g/l	
v (g/l.min)	GH (%)	v (g/l.min)	GH (%)	v (g/l.min)	GH (%)	v (g/l.min)	GH (%)	v (g/l.min)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,44	3,54	2,16	3,50	1,50	2,15	1,40	1,02	0,73	0,80
1,04	7,08	0,82	5,84	1,25	3,58	0,94	2,04	0,58	1,59
0,52	10,62	0,50	7,00	0,67	5,01	0,51	3,06	0,48	2,39
0,25	14,15	0,29	8,17	0,63	6,45	0,43	5,62	0,41	3,18
0,15	17,69	0,18	9,34	0,45	7,88	0,37	6,64	0,32	4,78
0,07	21,23	0,15	10,51	0,22	9,31	0,27	7,66	0,25	6,37
0,02	24,77	0,15	11,67	0,20	10,75	0,21	8,17	0,20	7,96
0,01	28,31	0,12	12,84	0,09	11,46	0,22	8,68	0,16	9,15
0,00	31,85	0,07	14,01	0,07	12,89	0,14	9,19	0,14	9,95
0,00	35,39	0,09	15,17	0,05	13,61	0,13	9,70	0,13	10,75
0,00	38,93	0,06	16,34	0,04	14,33	0,12	10,21	0,11	11,54
0,00	42,46	0,04	17,51	0,03	15,76	0,12	10,72	0,09	12,34
		0,04	18,68	0,04	16,48	0,12	11,74	0,08	13,14
		0,03	19,84	0,03	17,91	0,10	12,77	0,07	13,93
		0,03	21,01	0,02	18,62	0,08	13,79	0,05	14,73
		0,02	22,18	0,02	19,34	0,06	14,81	0,04	15,52
		0,02	23,35	0,02	20,06	0,04	15,83	0,03	16,32
		0,02	24,51	0,02	21,49	0,04	16,85	0,02	17,12
		0,02	25,68	0,02	22,92	0,02	18,89	0,01	17,91
		0,01	26,85	0,01	23,64	0,01	19,92	0,01	18,71
		0,00	28,01	0,01	24,36	0,01	20,94	0,01	19,50
		0,01	29,18	0,01	25,79	0,01	21,45	0,01	20,30
		0,00	30,35	0,00	26,50	0,01	22,47	0,01	21,10
		0,00	31,52	0,00	27,22	0,01	23,49	0,01	21,89
				0,00	27,94	0,00	24,00	0,00	22,69

La representación (figura 5.39) frente a la concentración inicial de sustrato proteico de los valores obtenidos interpolando para determinados grados de hidrólisis (tabla 5.17) muestra una clara disminución de la velocidad de reacción con el aumento del grado de hidrólisis y con el aumento de la concentración de sustrato.

Tabla 5.17.- Velocidad de reacción para grados de hidrólisis determinados y distintas concentraciones de sustrato proteico ($E_0 = 2,81$ UA/l, $T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8,0$)

So (g/l)	GH (%)		
	5	10	15
0,00	0,00	0,00	0,00
3,45	1,57	0,57	0,21
10,48	0,71	0,25	0,09
17,45	0,58	0,19	0,06
24,76	0,45	0,14	0,04
32,10	0,34	0,11	0,04

La disminución de la velocidad de hidrólisis con la concentración de sustrato es indicativa de inhibición por sustrato. Este hecho no resulta extraño ya que hay que recordar que el sustrato utilizado tiene dos componentes principales (el proteico y el lipídico) y existen investigaciones que demuestran que los lípidos son inhibidores del Subtilisin Carlsberg que es el componente principal de la Alcalase 2.4L. Sampedro et al. (2019), en un estudio sobre hidrólisis de la proteína de las vísceras de tilapia roja, comprobaron cómo la adición de lípidos inhibía notablemente la Alcalase 2.4 L utilizada como proteasa en el proceso.

Por otra parte, la obtención de velocidades de hidrólisis menores para igual concentración de sustrato proteico al aumentar el grado de hidrólisis (figura 5.39) es indicativa de un proceso de inhibición, en este caso, por producto. En el caso de la hidrólisis de sustratos proteicos, es bastante habitual encontrar inhibición debido a la formación de péptidos de menor peso molecular. Así, para la Alcalase, existen antecedentes de inhibición por producto en la hidrólisis de pescados como, por ejemplo, ciprínidos plateados (Ogonda et al., 2017) o salmón (Valencia, 2014) y también en la hidrólisis de carne magra de vaca (O'Meara y Munro, 1985).

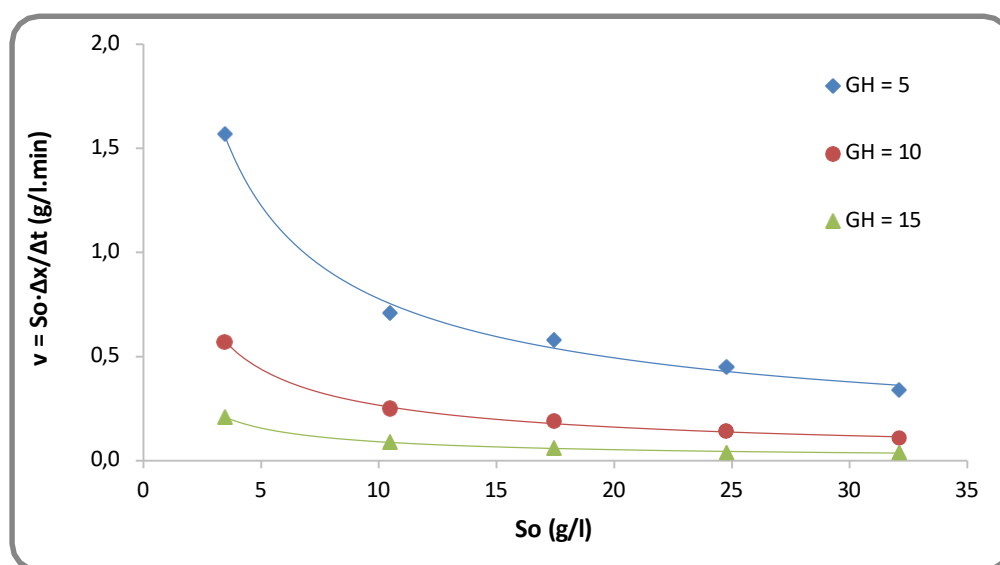


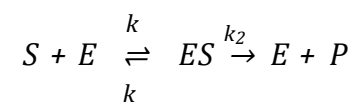
Figura 5.39.- Velocidad de reacción para diferentes concentraciones iniciales de sustrato proteico y diferentes grados de hidrólisis

Dado que se ha comprobado la existencia de inhibición por sustrato y producto, así como desactivación de la enzima, se propone a continuación un mecanismo que incluye estos fenómenos para justificar la ecuación que define la cinética del proceso.

5.2.6.3. Mecanismo de la reacción de hidrólisis con Alcalase

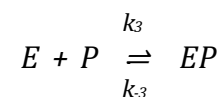
La cinética del proceso puede describirse, por tanto, por medio de cuatro reacciones:

- *Reacción de hidrólisis*: en la que, inicialmente, se forma un complejo enzima-sustrato que se descompone, posteriormente, para liberar el producto:

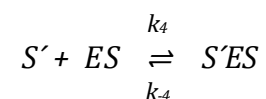


- *Reacciones de inhibición de la enzima:* Como también se ha comprobado, la reacción se ve inhibida:

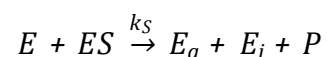
a) por los productos de la misma, ya que algunos péptidos de cadena corta formados en la hidrólisis pueden competir con el sustrato proteico:



b) por la fracción lipídica del sustrato ya que los lípidos pueden competir con la fracción proteica del sustrato:



- *Reacción de desactivación enzimática:* el hecho de que se haya comprobado experimentalmente que la desactivación de la enzima disminuye en presencia de sustrato siguiendo una cinética de orden dos parece indicar que en el mecanismo de desactivación interviene el sustrato de modo que el proceso puede venir dado por la reacción entre la enzima libre y el complejo enzima-sustrato:



donde E es la proteasa total, S la fracción proteica del sustrato, S' la fracción lipídica del sustrato, ES el complejo proteasa-sustrato proteico, $S'ES$ el complejo sustrato lipídico-proteasa-sustrato proteico, P el producto, EP el complejo proteasa-producto, E_a es la proteasa activa, E_i es la proteasa desactivada y $k_1, k_{-1}, k_2, k_3, k_{-3}, k_4, k_{-4}$ y k_5 las constantes cinéticas de reacción.

La velocidad de hidrólisis estará determinada por la etapa irreversible de formación de producto:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2 [ES] \quad \text{Ec. 5.7}$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1 [E][S] + k_{-4} [S'ES] - (k_{-1} + k_2) [ES] - k_4 [ES][S'] \quad \text{Ec. 5.11}$$

y el balance de materia al complejo $S'ES$ será el que aparece a continuación:

$$\frac{d[S'ES]}{dt} = k_4 [ES][S'] - k_{-4} [S'ES] \quad \text{Ec. 5.12}$$

Teniendo en cuenta que fracción lipídica y la fracción proteica representan el 68,91 % y el 19,03 % del sustrato, respectivamente, se puede expresar la concentración de la fracción lipídica (S') en función de la concentración de la fracción proteica (S) del siguiente modo:

$$[S'] = \frac{68,91}{19,03} [S] \quad \text{Ec. 5.13}$$

Con lo que la ecuación 5.12 quedaría así:

$$\frac{d[S'ES]}{dt} = k_4 \frac{68,91}{19,03} [ES][S] - k_{-4} [S'ES] \quad \text{Ec. 5.14}$$

Briggs y Haldane (Dixon, 1979) postularon que, aunque en el instante de mezcla, la variación de la concentración de complejo tenía que ser positiva debido a que en ese instante no existe nada de complejo enzima-sustrato, la velocidad de eliminación de dicho complejo se incrementaría rápidamente de forma que, después de muy poco tiempo, se compensaría con la velocidad de producción, alcanzándose el estado estacionario para dicho complejo. Además, en las condiciones de operación, las concentraciones de sustrato y producto son mucho mayores que las de enzima por lo que las variaciones que pueda haber en el complejo enzima-sustrato son despreciables frente a las variaciones de reactivos y productos.

Según eso, $d[ES]/dt = 0$ y $d[S'ES]/dt = 0$, por lo que:

$$[ES] = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [E][S] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad \text{Ec. 5.15}$$

$$[S'ES] = \frac{k_4 \frac{68,91}{19,03}}{k_{-4}} [ES][S] = \frac{[E] [S]^2}{K_M K_S} \quad \text{Ec. 5.16}$$

donde K_M es la constante de Michaelis-Menten y K_S es la constante efectiva de inhibición por sustrato.

De modo análogo, el balance de materia al complejo enzima-producto en el estado estacionario vendrá dado por:

$$\frac{d[EP]}{dt} = k_3 [E] [P] - k_{-3} [EP] = 0 \quad \text{Ec. 5.17}$$

$$[EP] = \frac{k_3}{k_{-3}} [E] [P] = \frac{[E][P]}{K_P} \quad \text{Ec. 5.18}$$

siendo $[P]$ la concentración de producto, $[EP]$ la concentración de complejo enzima-producto y K_P la constante global de inhibición por producto.

Puesto que toda la enzima presente está libre o complejada con el sustrato o con el producto, teniendo en cuenta las ecuaciones 5.15, 5.16 y 5.18, se puede poner que:

$$E = [E] + [ES] + [S'ES] + [EP] = [E] \left(1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[S]^2}{K_M K_S} + \frac{[P]}{K_P} \right) \quad \text{Ec. 5.19}$$

La concentración de enzima libre vendrá dada pues por la siguiente expresión:

$$[E] = \frac{E}{1 + \frac{[S]}{K_M} + \frac{[S]^2}{K_M K_S} + \frac{[P]}{K_P}} \quad \text{Ec. 5.20}$$

En este punto se van a hacer dos consideraciones:

- Que, dada la elevada concentración de lípidos en el reactor, predomina la inhibición por sustrato frente a la inhibición por producto:

$$\frac{[S]}{K} + \frac{[S]^2}{K K_S} \gg 1 + \frac{[P]}{K_P}$$

- Que, dado que en las condiciones experimentales utilizadas la concentración inicial de proteasa es mucho menor que la concentración inicial de sustrato proteico ($E_0 \lll S_0$) y que, por ello, la concentración de complejo formado es necesariamente mucho menor que la concentración inicial de sustrato ($[ES] \lll S_0$), la concentración de sustrato durante el proceso coincide con la concentración inicial del mismo:

$$[S] \approx S_0$$

con lo que

$$[E] = \frac{E}{\frac{S_0}{K_M} + \frac{S_0^2}{K_M K_S}} \quad \text{Ec. 5.21}$$

Combinando las ecuaciones 5.10 y 5.21 se obtiene la siguiente expresión:

$$- \frac{dx}{dE} = \frac{k_2 (K_S + S_0)}{k_5 K_M K_S} \frac{l}{E} \quad \text{Ec. 5.22}$$

Separando variables e integrando la ecuación 5.22 entre los límites de las condiciones iniciales y finales de la reacción, se obtiene una expresión que da la evolución de la concentración de enzima en función del grado de hidrólisis:

$$E = E_0 e^{-\frac{k_S K_M K_S}{k_2 (K_S + S_0)} x} \quad \text{Ec. 5.23}$$

La combinación de las ecuaciones 5.8, 5.15 y 5.21 con esta ecuación (5.23) y considerando, como ya se ha indicado, que $[S] \approx S_0$, la ecuación de velocidad vendrá dada por:

$$v = S_0 \frac{dx}{dt} = \frac{k_2 K_S}{(K_S S_0 + S_0^2)} S_0 E_0 e^{-\frac{k_S K_M K_S}{k_2 (K_S + S_0)} x} \quad \text{Ec. 5.24}$$

o bien

$$\frac{dx}{dt} = \frac{k_2 K_S E_0}{(K_S S_0 + S_0^2)} e^{-\frac{k_S K_M K_S}{k_2 (K_S + S_0)} x} \quad \text{Ec. 5.25}$$

La sustitución de $x = GH/100$ lleva a obtener la expresión empírica dada por la ecuación 5.5, en la que:

$$K_1 = \frac{k_2 K_S E_0}{(K_S S_0 + S_0^2)} 100 \quad \text{Ec. 5.26}$$

$$K_2 = \frac{k_S K_M K_S}{k_2 (K_S + S_0)} \frac{1}{100} \quad \text{Ec. 5.27}$$

En el mecanismo propuesto no se ha tenido en cuenta la insolubilidad del sustrato y la posible adsorción de la enzima en el mismo, previa a la formación del complejo enzima-sustrato. Aunque algunos autores han contemplado esta posibilidad, se ha demostrado que la etapa de adsorción no es controlante (O'Meara y Munro, 1985) por lo que, a pesar de no haber sido considerada, el ajuste del modelo es significativamente bueno.

5.2.6.4. Constantes y energías de activación y desactivación del proceso con Alcalase

Las expresiones obtenidas para K_1 y K_2 en las ecuaciones 5.25 y 5.26, respectivamente, indican que el parámetro K_1 depende de la concentración inicial tanto de proteasa como de sustrato proteico mientras que el parámetro K_2 es independiente de la concentración inicial de proteasa, aunque sí depende de la de sustrato proteico. Al comprobar esto con los resultados experimentales (tabla 5.14) se observa que, efectivamente, K_2 no varía mientras se mantengan los valores de S_0 constantes, aunque los valores de E_0 sí se modifiquen.

Con la finalidad de obtener los valores de las constantes cinéticas, se han linealizado las ecuaciones 5.26 y 5.27 y se han realizado las representaciones correspondientes.

La linealización de la ecuación 5.27 lleva a la expresión:

$$\frac{1}{K_2} = \frac{100 k_2}{k_S K_M} + \frac{100 k_2}{k_S K_M K_S} S_0 \quad \text{Ec. 5.28}$$

que aparece representada en la figura 5.40.

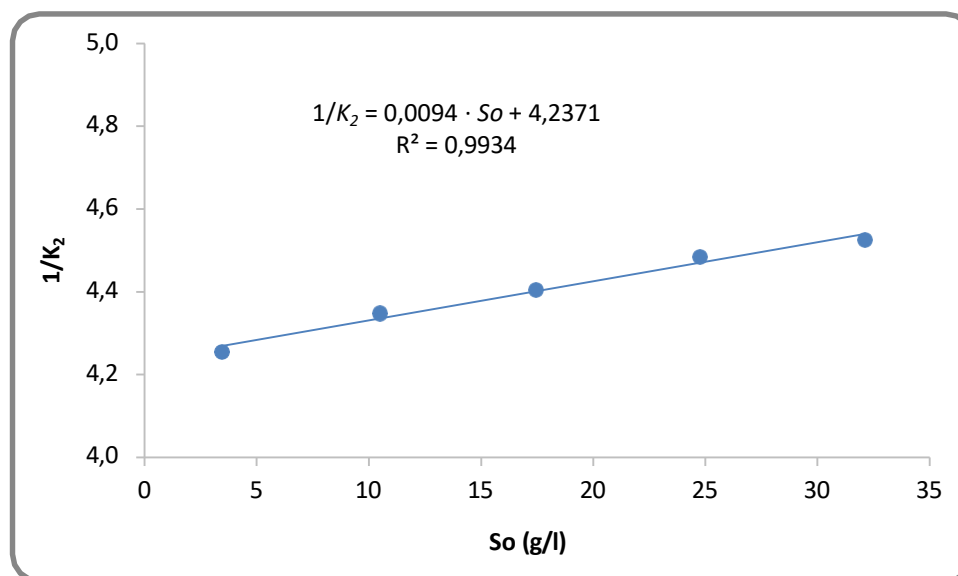


Figura 5.40.- Relación entre el parámetro K_2 y la concentración inicial de sustrato proteico S_0

El cociente entre la ordenada en el origen y la pendiente de la recta obtenida permite obtener el valor de la constante de inhibición por sustrato K_S :

$$K_S = 450,76 \text{ g/l}$$

La linealización de la ecuación 5.26 lleva a la expresión:

$$\frac{1}{K_I} = \frac{(K_S + S_0^2)}{100 k_2 K_S} \frac{1}{E_0} \quad \text{Ec. 5.29}$$

Para que esta ecuación sea homogénea es preciso que tanto la concentración inicial de sustrato como la de enzima estén expresadas en g/l. Por ello en la tabla siguiente se pone la equivalencia entre los μl de enzima añadidos al reactor, las UA/l (que es la unidad que se ha utilizado hasta ahora para expresar la concentración inicial de enzima por ser mejor indicador de la actividad enzimática) y los g/l, teniendo en cuenta que la actividad de la Alcalase es de 2.4 UA/g, su densidad es de 1.17 g/ml y que el volumen total de mezcla en el reactor es de 0.3 l.

Tabla 5.18.- Proteasa inicial añadida al reactor (E_0) expresada en diferentes unidades

μl	g/l	UA/l
100	0,39	0,94
200	0,78	1,87
300	1,17	2,81
400	1,56	3,74
500	1,95	4,68

La representación de la inversa de K_I frente a la inversa de la concentración inicial de proteasa E_0 expresada en g/l se incluye en la figura 5.41.

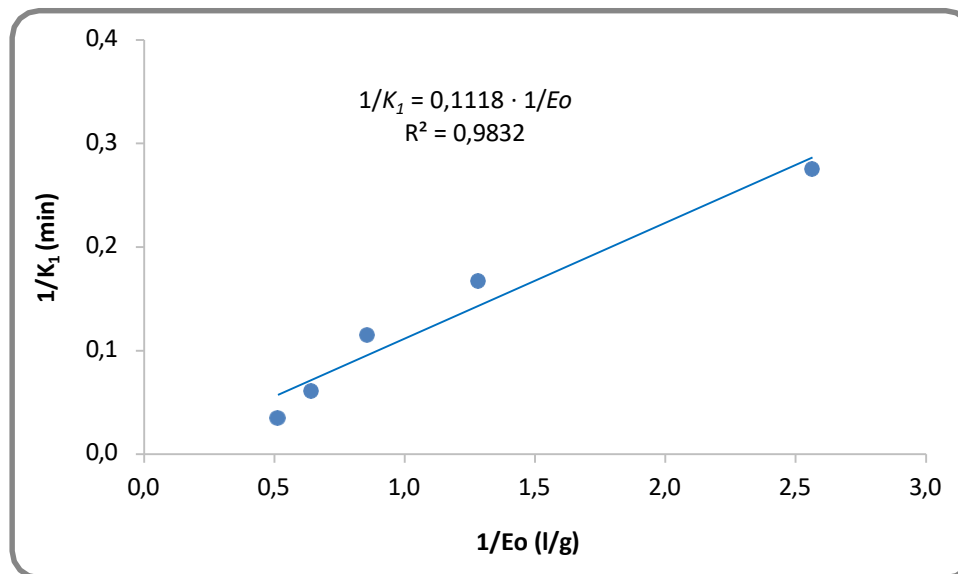


Figura 5.41.- Relación entre el parámetro K_I y la concentración inicial de proteasa E_0 ($S_0 = 17,45$ g/l)

El producto de la inversa de la ordenada en el origen obtenida en este ajuste y la expresión $\frac{(K_S S_0 + S_0^2)}{100 K_S}$ en la tanto K_S como S_0 son ya conocidos permite calcular el valor de la constante de velocidad k_2 :

$$k_2 = 1,62 \text{ min}^{-1}$$

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores y combinando las ecuaciones 5.9, 5.15 y 5.21, se llega a:

$$- \frac{dE}{dt} = k_5 K \left(\frac{E^2}{S_0 (1 + S_0/K_S)^2} \right) = k_d \left(\frac{E^2}{S_0 (1 + S_0/K_S)^2} \right) \quad \text{Ec. 5.30}$$

expresión en la que se ha considerado que el producto $k_5 K_M$ es igual a la constante de desactivación de la enzima, tal y como hicieron otros investigadores (Ruan et al., 2010).

Con esta consideración y multiplicando la inversa de la ordenada en el origen de la representación de $1/K_2$ frente a S_0 por el valor calculado para la constante k_2 , se puede determinar el valor de la constante de desactivación de la Alcalase:

$$k_d = 0,38 \text{ min}^{-1}$$

Los valores obtenidos para las constantes son del mismo orden que los obtenidos por Zapata et al. (2018) en el estudio de la hidrólisis con Alcalase 2.4L de residuos de pescado que tienen características análogas a los residuos cárnicos utilizados en este estudio en cuanto a contenido de proteínas y grasas. Ello, junto con el buen ajuste de las rectas obtenidas al representar K_1 y K_2 frente a S_0 y E_0 , es indicativo de la bondad del mecanismo propuesto.

Puesto que el parámetro K_1 está relacionado con la constante de velocidad de reacción k_2 y $K_1 \cdot K_2$ está relacionado con la constante de desactivación de la enzima k_d , los cambios en K_1 y en $K_1 \cdot K_2$ producidos por la temperatura (T) seguirán la ecuación de Arrhenius:

$$K_1 = A_a e^{-\frac{\Delta E_a}{R T}} \quad \text{Ec. 5.31}$$

$$K_1 \cdot K_2 = A_d e^{-\frac{\Delta E_d}{R T}} \quad \text{Ec. 5.32}$$

que también pueden expresarse así:

$$\ln K_1 = \ln A_a - \frac{\Delta E_a}{R} \frac{1}{T} \quad \text{Ec. 5.33}$$

$$\ln (K_1 \cdot K_2) = \ln A_d - \frac{\Delta E_d}{R} \frac{1}{T} \quad \text{Ec. 5.34}$$

donde A_a y A_d son los factores de frecuencia, ΔE_a y ΔE_d son las energías de activación de la hidrólisis y de desactivación de la proteasa, respectivamente, y R es la constante de los gases (8,314 J/mol·K).

Esta linealización de la ecuación de Arrhenius permite obtener gráficamente (figuras 5.42 y 5.43) el valor de la energía de activación de la hidrólisis enzimática de la fracción proteica del residuo cárnico con Alcalase y el valor de la energía de desactivación de la proteasa.

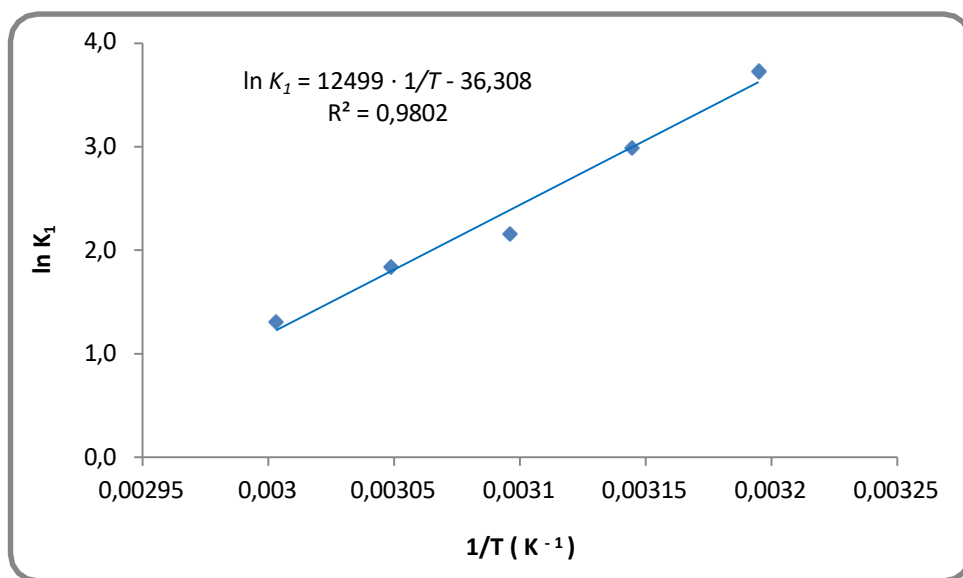


Figura 5.42.- Variación de la constante cinética K_1 con la temperatura

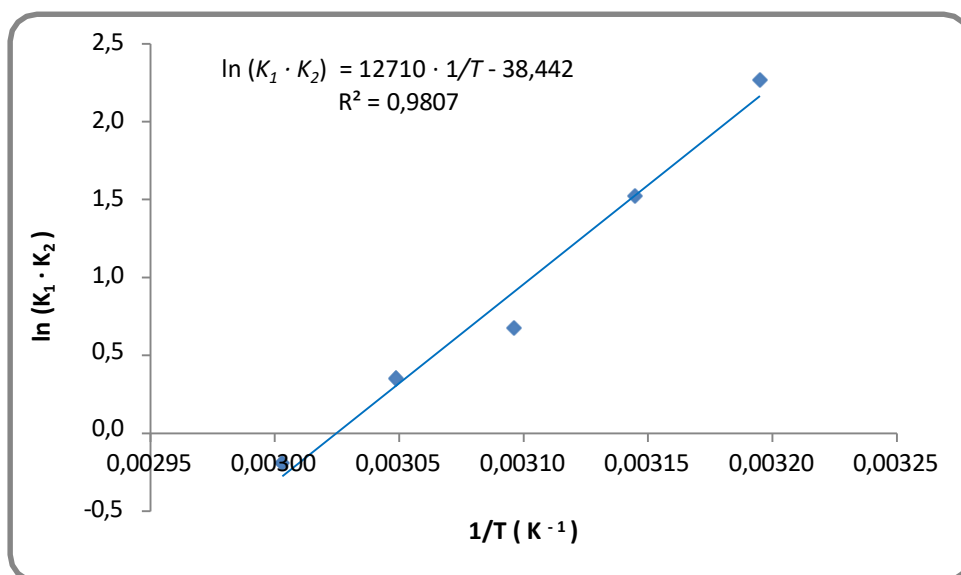


Figura 5.43.- Variación del producto de las constantes cinéticas K_1 y K_2 con la temperatura T

Los valores así obtenidos para las constantes de activación y desactivación fueron:

$$\Delta E_a = - 103,92 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta E_d = - 105,67 \text{ kJ/mol}$$

La comparativa de los valores obtenidos para las energías de activación y desactivación enzimática ΔE_A y ΔE_d con los obtenidos en otros trabajos bibliográficos no es posible ya que no hay estudios con residuos de carnicería ni siquiera hay estudios con residuos de pescado en los que se hayan determinado estos parámetros. Por otra parte, los valores aquí obtenidos tampoco son comparables con los obtenidos para la misma proteasa, pero con distinto sustrato porque, en el proceso de hidrólisis, la influencia del sustrato y el procedimiento experimental en el mecanismo de hidrólisis son determinantes.

Los valores negativos obtenidos para las energías de activación y desactivación parecen contradecir la ley de Arrhenius. Sin embargo, se ha comprobado que los coeficientes cinéticos disminuyen al aumentar la temperatura de manera que se alcanzan energías de activación o desactivación negativas en diversas situaciones:

- Procesos que transcurren en varias etapas (Bertrán y Núñez, 2007)
- Procesos con formación de complejos intermedios (Mozurkewich y Benson, 1984).
- Procesos producidos en dos etapas: la primera reversible y la segunda irreversible (Muench et al., 1996).
- Procesos con desnaturalización de la enzima (Fabiano y Pergo, 2002).

Todas estas circunstancias están presentes en el estudio realizado ya que, como se ha indicado en el mecanismo que justifica el proceso, éste tiene lugar en varias etapas: una reversible en la que se forma el complejo enzima-sustrato y una irreversible en la que el complejo da lugar al producto liberando de nuevo la enzima desnaturalizada en parte. Estos resultados se ven confirmados por el hecho de que hay antecedentes de energías de activación negativas al utilizar hidrolasas (Zhang et al. 2011).

5.3. Hidrólisis con lipasas

En el estudio de la hidrólisis de los lípidos del residuo cárnico con lipasas se han analizado: el tipo y la concentración de lipasa, la concentración de sustrato lipídico, la relación lipasa/sustrato lipídico, la temperatura, el pH y el tiempo de reacción.

Los equipos, métodos y procedimientos utilizados están descritos en el Capítulo IV de Materiales y Métodos. Con el fin de obtener datos fiables y reproducibles, todos los experimentos de hidrólisis se llevaron a cabo, como mínimo, por duplicado, y todos los análisis se llevaron a cabo, como mínimo, por triplicado apareciendo en esta memoria los valores medios de los resultados obtenidos que están detallados en el Anejo III.

5.3.1. Influencia del tipo de lipasa y del tiempo de hidrólisis

Se utilizaron cinco enzimas diferentes para realizar la hidrólisis enzimática de la fracción lipídica del sustrato: Lipozyme CALB L, Lipozyme TL 100L, Novocor AD L, Novozym 51032, y Resinase HT. También todas ellas son lipasas comerciales (de Novozymes) pero con distintas características. La elección se ha hecho en función de su fuente, su especificidad respecto al sustrato y su pH y temperatura óptimos.

Lipozyme CALB L es una lipasa específica de la levadura *Candida antarctica* B (Novozymes, 2020a). Es estable en un amplio intervalo de pH (5-9) y temperatura (30-60°C) y presenta un elevado grado de especificidad por sustratos de tipo éster o alcohol (Novozymes, 2020b). Comercialmente se presenta en forma líquida con una densidad de 1,20 g/ml (Novozymes, 2020c).

Lipozyme TL 100L es una lipasa producida por fermentación sumergida del *Thermomyces lanuginosus* modificado genéticamente, aunque la enzima en sí no está modificada (Novozymes, 2020a). Es un catalizador efectivo para procesos de transesterificación, interesterificación e hidrólisis de ésteres cuya máxima actividad se alcanza a pH entre 7 y 10 y temperaturas entre 20 y 50°C (Novozymes, 2020b). El producto comercial se expende como líquido con una densidad de 1.05g/ml (Novozymes, 2020c).

Novocor AD L es una lipasa procedente de la *Candida antarctica* A (Novozymes, 2020a) que es estable en el intervalo de pH 5-9 y en el rango de temperaturas 30-60 (Novozymes, 2020b). Es muy eficaz cuando se trata de reaccionar con ésteres impedidos estéricamente (Novozymes, 2020b). Se presenta comercialmente en forma líquida con una densidad de 1.17 g/ml (Novozymes, 2020c).

Novozym 51032 es una lipasa originada por el microorganismo *Humicola insolens* que actúa como catalizador eficaz en la hidrólisis de ésteres, así como en la de una variedad de moléculas que contenga enlaces éster (Novozymes, 2020a). Sus condiciones óptimas de utilización se encuentran a pH comprendido entre 7 y 10 y temperatura comprendida entre 35 y 70°C (Novozymes, 2020b). El líquido comercial tiene una densidad de 1.04 g/ml (Novozymes, 2020c).

Resinase HT es una lipasa procedente del *Aspergillus oryzae* altamente eficaz para la hidrólisis de los ésteres y triglicéridos (Novozymes, 2020a). Sus condiciones óptimas de trabajo son temperaturas de 50-70°C, aunque es estable hasta temperaturas de 90°C, y pH entre 5 y 8 (Buchert et al., 2002). Se expende comercialmente en forma líquida con una densidad de 1.05 g/ml (Novozymes, 2020c).

Tabla 5.19.- Características de las lipasas utilizadas

ENZIMA	FUENTE	ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO	ESTADO	pH	T (°C)	Actividad enzimática* (kLU/g)
Lipozyme CALB L	<i>Candida Antartica B</i>	Ésteres y alcoholes	Líquido	5-9	30-60	5
Lipozyme TL 100L	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Ésteres y dicarboxilatos	Líquido	7-10	20-50	100
Novocor AD L	<i>Candida Antartica A</i>	Ésteres impedidos estéricamente	Líquido	5-9	30-60	6
Novozym 51032	<i>Humicola insolens</i>	Ésteres	Líquido	7-10	35-70	15
Resinase HT	<i>Aspergillus oryzae</i>	Ésteres y triglicéridos	Líquido	5-8	50-70	50

* Medida por el método descrito en el apartado 4.12 del Capítulo IV.

También en este estudio las hidrólisis realizadas con las diferentes lipasas se han llevado cabo en idénticas condiciones de operación para así poder comparar los resultados obtenidos en el proceso.

Los valores de pH y temperatura de hidrólisis se fijaron en aquellos para los que las lipasas ensayadas muestran máxima actividad (tabla 5.19): pH de 8 y temperatura de 50°C.

Como ya se indicó en el apartado 5.2.1, se pueden seguir diferentes criterios para la selección de la enzima más adecuada: en función de su actividad (Kristinsson et al., 2000) o en función de la concentración necesaria para alcanzar un determinado grado de hidrólisis (Aspmo et al., 2005). Por coherencia con el criterio adoptado en el estudio con proteasas, en el estudio con lipasas también se eligió la primera opción para elegir la enzima más conveniente para la hidrólisis de los residuos de carnicería, comparando los grados de hidrólisis obtenidos para una misma actividad inicial de lipasa en el reactor: $Eo' = 52,44$ kLU/l.

Puesto que las lipasas utilizadas tenían distinta actividad (tabla 5.19), para obtener la misma actividad en el reactor, fue preciso añadir diferentes volúmenes de las mismas al reactor: 2,63 ml de Lipozyme CALB, 0,15 ml de Lipozyme TL 100 L, 2,25 ml de Novocor AD L, 1,01 ml de Novozyme 51032 y 0,30 ml de Resinase TL.

La concentración de sustrato lipídico seleccionada para este estudio se ha fijado en $So' = 63,14$ g/l de lípidos (166,67 g/l de residuo cárnico en el reactor) debido a las dificultades existentes para agitar de forma adecuada la mezcla de residuo y agua para concentraciones de sustrato muy elevadas.

Con el fin de obtener un óptimo contacto entre el sustrato, el agua y la lipasa dentro del reactor de mezcla completa encamisado de 0,5 l en el que se llevaron a cabo las hidrólisis, se eligió una velocidad de agitación de 300 rpm después de haber ensayado otras velocidades.

Para fijar el tiempo de hidrólisis se realizaron experimentos con una duración de cuatro horas. En la figura 5.44 se han representado los valores medios de uno de los experimentos, el correspondiente a Novozym 51032. En ella se puede observar que, a partir de tres horas, la curva de hidrólisis no varía prácticamente: en la última hora el

grado de hidrólisis apenas ha aumentado del 56 al 59 %. Por ello se ha elegido una duración de 4 horas como tiempo máximo de reacción.

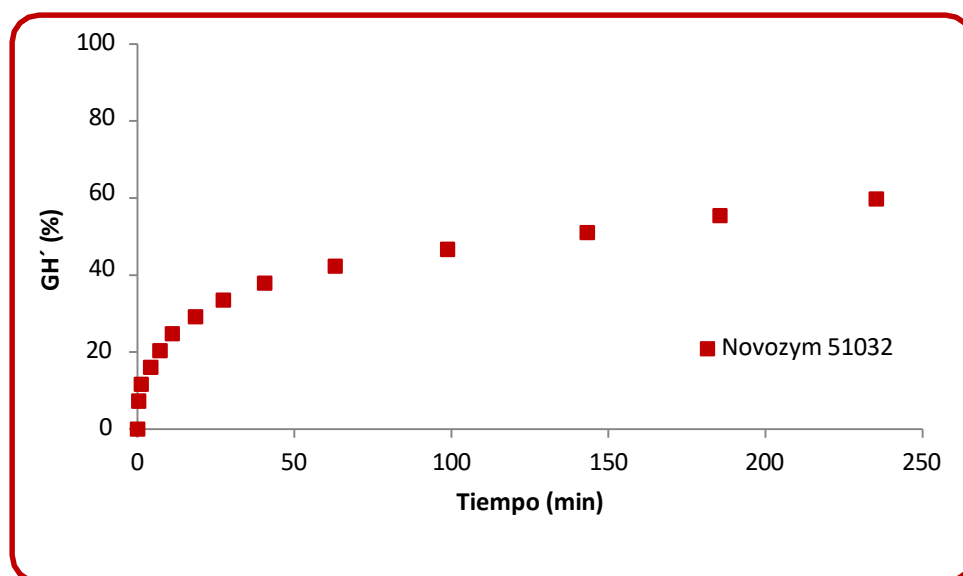


Figura 5.44.- Influencia del tiempo de reacción en el grado de hidrólisis con lipasas de los residuos cárnicos (GH')

Las condiciones de operación utilizadas en este estudio teniendo todo esto en cuenta se resumen en la tabla 5.20.

Tabla 5.20.- Condiciones de operación para los análisis de hidrólisis enzimática con distintas lipasas

pH	8
Temperatura (°C)	50
Tiempo (min)	240
Velocidad de agitación (rpm)	300
So' (g/l)	63,14
Eo' (kLU/l)	52,44

Para determinar la influencia de las lipasas en la hidrólisis enzimática se siguió un procedimiento análogo al seguido con las proteasas: se realizó el seguimiento del grado de hidrólisis (GH') con el tiempo determinando, para un tiempo de 4 horas, el GH' máximo alcanzado y las cantidades de sólido no solubilizado, proteína solubilizada, colágeno en fase sólida, lípidos recuperados y de ácidos grasos libres.

El seguimiento del grado de hidrólisis (GH') se realizó según el método de pH-stato descrito en el 4.13 del Capítulo IV de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos aparecen en las tablas IIIA.1-III A.5 del Anexo III.

La evolución de las curvas de hidrólisis del sustrato lipídico es análoga a la evolución de las curvas de hidrólisis del sustrato proteico: se puede observar (figura 5.33) cómo, al comienzo de la reacción, el grado de hidrólisis aumenta rápidamente debido a que hay muchos enlaces lipídicos susceptibles de ser rotos, pero, al transcurrir el tiempo de reacción, el aumento del grado de hidrólisis es menor ya que van quedando menos enlaces lipídicos para romper.

De los resultados alcanzados (figura 5.45) se deduce que, a pH 8 y 50°C, el GH obtenido presenta una variación entre el 6% y el 90%, siendo Resinase la lipasa con la que se consigue un valor más alto, seguida de Novozym y Lipozyme TL, siendo Novocor y Lipozyme CALB las menos eficaces.

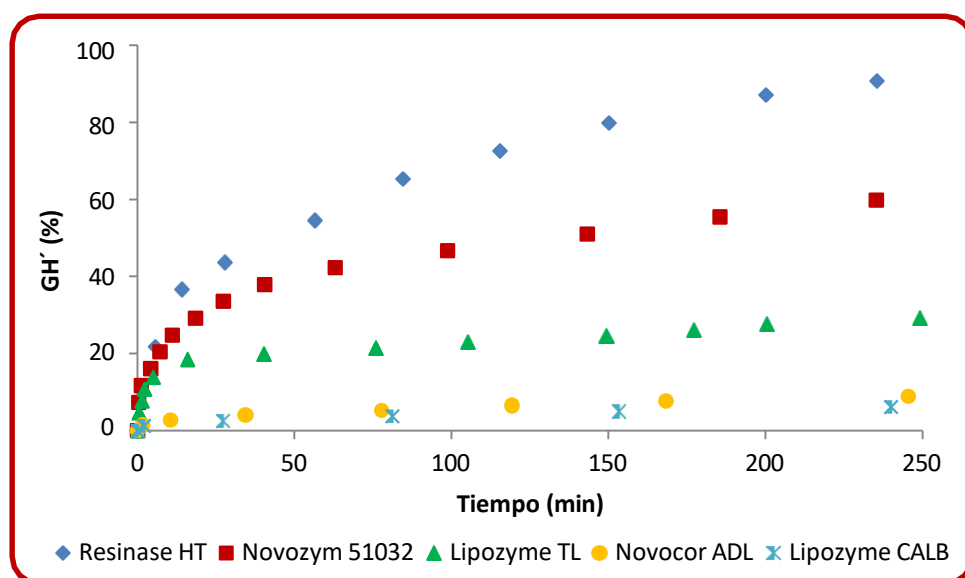


Figura 5.45.- Influencia del tipo de lipasa en el grado de hidrólisis (GH')

El diferente comportamiento de las enzimas puede justificarse en función de las características de las mismas (tabla 5.19), observándose que las lipasas de origen fúngico (Resinase, Novozym y Lipozyme TL) resultan más eficaces que las lipasas obtenidas de levaduras (Novocor y Lipozyme CALB). Las variadas propiedades y las interesantes características que exhiben las lipasas de origen fúngico les han conferido una gran aplicación comercial e industrial, siendo uno de los grupos de enzimas más utilizados actualmente (Martínez-Corona et al., 2019).

El hecho de que la Resinase sea la lipasa más eficaz en la hidrólisis de los lípidos presentes en los residuos radica en su especificidad para el sustrato ya que es la única específica para triglicéridos (Bendikienė et al., 2008; Novozymes, 2020a).

Lamentablemente, para las lipasas elegidas no existen estudios previos ni con residuos cárnicos ni con sustratos similares que permitan corroborar estos resultados.

Para el estudio de los productos recuperados una vez finalizada la hidrólisis, se siguieron los pasos indicados a continuación de acuerdo con la metodología indicada en el Capítulo IV:

- Se separaron las fases (sólida, acuosa y lipídica) contenidas en el reactor mediante filtración y centrifugación.
- Se secó y pesó la fase sólida determinando el porcentaje de sólido no solubilizado a partir de la relación entre esa cantidad de sólido seco que no se había solubilizado y la cantidad de residuo seco puesto inicialmente en el reactor (ver resultados en tabla IIIA.6 del Anexo III).
- Se calculó la cantidad de colágeno presente en la fase sólida seca determinando el porcentaje recuperado a partir de la relación de ese valor y la cantidad de colágeno contenida en el residuo seco puesto inicialmente en el reactor (tabla IIIA.8 del Anexo III).
- Se analizó la proteína contenida en la fase líquida determinando el porcentaje de proteína solubilizada a partir de la relación entre la cantidad de proteína así determinada y la cantidad de proteína contenida en el residuo seco puesta inicialmente en el reactor (tabla IIIA.7 del Anexo III).

- Se pesó la fase lipídica obtenida, calculando el porcentaje de lípidos recuperados a partir de la relación entre la cantidad de lípidos así determinados y la cantidad de lípidos contenida en el residuo seco puesta inicialmente en el reactor (tabla IIIA.9 del Anexo III).
- Se analizó la fase lipídica determinando la cantidad de ácidos grasos libres (AGLs) en ella (tabla IIIA.10 del Anexo III).

Estos mismos pasos se han seguido en los estudios posteriores de este apartado.

Al igual que en el estudio con proteasa y tal y como se puede comprobar a continuación, el estudio de la recuperación de productos con mayor valor añadido a partir del residuo para las diferentes lipasas estudiadas ha demostrado que el parámetro determinante de dicha recuperación es el grado de hidrólisis alcanzado independientemente de la enzima utilizada.

En la figura 5.46 se ha representado el porcentaje de sólido no solubilizado (tabla IIIA.6 del Anexo III) frente al grado de hidrólisis observándose que es inversamente proporcional al mismo.

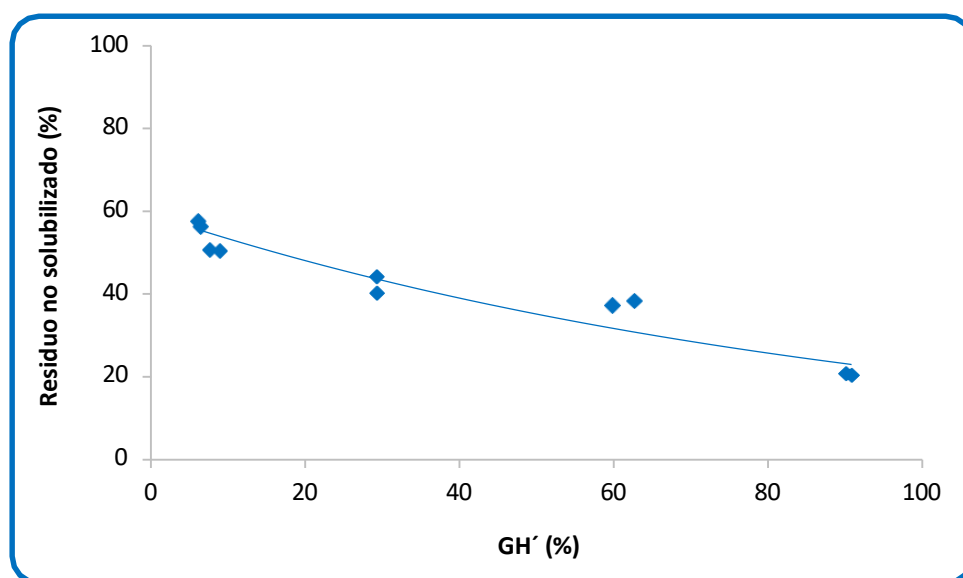


Figura 5.46.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas lipasas en el porcentaje de residuo no solubilizado

Este comportamiento se justifica al analizar el porcentaje de lípidos recuperados (tabla IIIA.9 del Anexo III). Opuestamente a lo que ocurre con el porcentaje de residuo no solubilizado, el porcentaje de lípidos recuperados presenta un claro aumento con el grado de hidrólisis (figura 5.47). Dado que el grado de hidrólisis es indicativo del porcentaje de ácidos grasos libres (AGL) separados (Avelar et al., 2013), cuanto mayor sea su valor, más lípidos se habrán recuperado, disminuyendo la cantidad de residuo que no se ha hidrolizado justificándose así los resultados obtenidos.

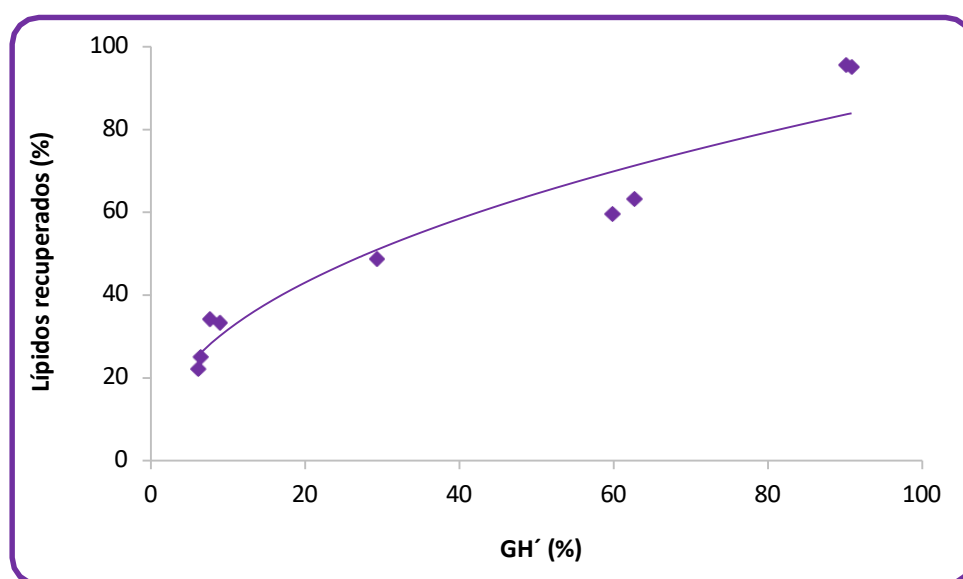


Figura 5.47.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas lipasas en el porcentaje lípidos recuperados

Por otra parte, al hidrolizarse los lípidos se favorece la liberación de la proteína presente en el residuo, aumentando por ello la cantidad de proteína solubilizada, aunque el incremento no es notable ya que el aumento de solubilidad de la proteína es exclusivamente debido a la hidrólisis de la proteína y ésta se debe exclusivamente al agua ya que las lipasas no favorecen la hidrólisis de la proteína y no hay proteasas en el medio.

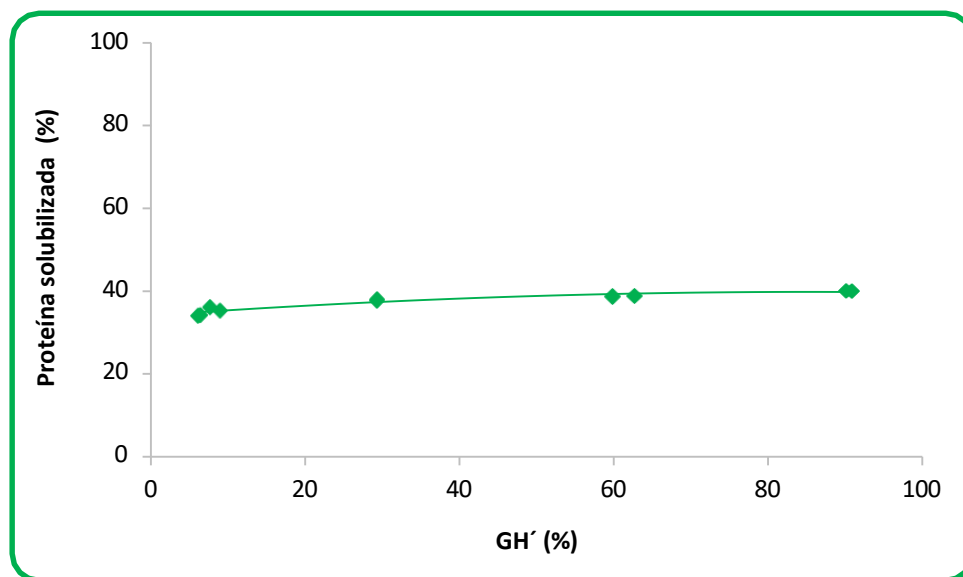


Figura 5.48.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas lipasas en el porcentaje de proteína solubilizada

En cuanto al porcentaje de colágeno recuperado, los resultados obtenidos parecen indicar que es independiente del grado de hidrólisis alcanzado durante el proceso tal y como puede verse en la figura 5.49. Como ya se ha indicado anteriormente, por ser el colágeno es una proteína fibrosa, su comportamiento frente a la hidrólisis es diferente al de las proteínas globulares. Dadas las características de éstas últimas, su hidrólisis es más fácil mientras que el colágeno es menos soluble y más difícil de hidrolizar en su estado nativo lo que hace que su grado de hidrólisis difiera del de las otras proteínas que constituyen los residuos cárnicos (Calvo, 2019). El hecho de que el colágeno sea más difícil de hidrolizar y que no haya en el medio proteasas que favorezcan la hidrólisis aumentando así su solubilidad hace que, prácticamente, todo el colágeno permanezca sin hidrolizar en la fase sólida y pueda recuperarse para aplicaciones industriales. Por tanto, la recuperación de proteína y de colágeno apenas se ve afectada por el grado de hidrólisis alcanzado con las lipasas.

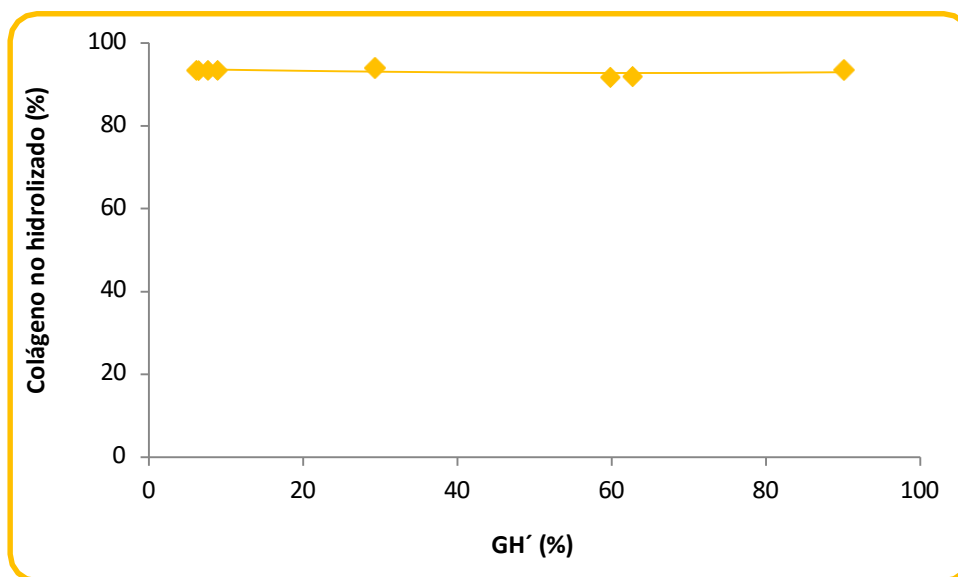


Figura 5.49.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas lipasas en el porcentaje colágeno no hidrolizado

En lo que sí va a afectar el grado de hidrólisis alcanzado es en la cantidad de ácidos grasos libres obtenidos (tabla IIIA.10 del Anexo III). En la tabla 5.21 se puede observar la cantidad de ácidos grasos obtenida con las distintas enzimas ensayadas. Esos resultados muestran que las lipasas procedentes de levaduras (Novocor y Lipozyme CALB) son menos eficaces que las lipasas de origen fúngico (Resinase, Novozym y Lipozyme TL) y que la Resinase es la lipasa más eficaz para la producción de ácidos grasos lo que se justifica por su especificidad para hidrolizar sustratos formados por triglicéridos. También se aprecia una relación entre el grado de hidrólisis y la cantidad de ácidos grasos producidos: cuanto mayor es el GH mayor es la cantidad de AGLs. Esta relación es lógica ya que el GH es calculado como la relación entre ácidos grasos libres separados y ácidos grasos totales susceptibles de ser liberados en la muestra (Avelar et al., 2013).

Tabla 5.21.- Cantidad de ácidos grasos obtenidos (mg ácido/g lípidos) con las lipasas utilizadas (mg ácido/g lípidos)

Ácido graso	Lipozyme CALB L	Novocor AD L	Lipozyme TL 100L	Novozym 51032	Resinase HT
C14:0	3,84±0,03	4,86±0,12	12,77±0,21	19,49±0,77	27,08±1,14
C15:0	0,21±0,01	0,26±0,03	0,57±0,01	0,80±0,02	0,97±0,04
C16:0	18,41±0,68	31,66±0,01	108,30±3,37	159,13±4,87	204,22±8,54
C16:1	0,10±0,01	0,20±0,05	0,65±0,01	0,93±0,01	1,07±0,00
C17:0	5,11±0,17	5,45±0,11	11,01±0,54	16,38±0,22	20,80±0,95
C17:1	0,81±0,02	0,96±0,01	1,63±0,08	2,49±0,42	3,40±0,13
C18:0	20,04±0,60	23,58±0,13	52,81±0,18	88,42±0,88	129,86±5,47
C18:1	13,61±0,90	18,37±0,49	81,71±0,15	149,93±7,33	225,59±7,82
C18:2	24,45±0,81	29,61±0,38	62,95±1,91	88,64±3,35	121,08±5,10
C18:3n3	5,69±0,19	6,90±0,24	14,43±0,05	25,21±0,45	30,80±1,10
C18:3n6	0,21±0,01	0,28±0,05	0,61±0,09	1,03±0,15	1,09±0,04
C20:0	0,23±0,00	0,29±0,02	0,58±0,02	0,85±0,04	0,99±0,03
C20:2	1,97±0,08	2,68±0,06	7,30±0,05	11,10±0,09	13,09±0,53
C20:3n3	7,94±0,55	9,81±0,81	16,57±0,26	23,19±0,74	29,42±1,07
C20:3n6+C21:0	8,50±0,26	10,16±0,21	19,57±0,59	32,15±1,67	42,24±0,08
C20:4n6	2,30±0,06	3,12±0,03	10,21±0,48	16,07±0,11	22,46±0,96
AGS	47,85±0,37	66,11±0,69	186,04±0,29	285,08±0,41	394,27±0,29
AGI	65,58±0,52	82,09±0,54	215,62±1,56	350,76±1,73	504,24±1,65

AGS: Ácidos grasos saturados

AGI: Ácidos grasos insaturados

5.3.2. Influencia de la concentración inicial de lipasa

Los resultados obtenidos anteriormente permitieron seleccionar la lipasa más adecuada para hacer el estudio de la influencia de la concentración de lipasa en el proceso; esta lipasa ha sido la Resinase HT que es la que permite obtener un mayor grado de hidrólisis en el proceso. Para llevar a cabo el estudio se ha trabajado en idénticas condiciones de operación para todas las concentraciones iniciales de enzima ensayadas para así poder comparar los resultados alcanzados en las hidrólisis.

Dichas condiciones de operación se fijaron a partir de las características de la enzima, seleccionando los valores de pH y temperatura en los cuales la Resinase muestra una actividad adecuada (tabla 5.19) y una gran estabilidad (Andrade et al., 2017).

Al igual que en el estudio de la influencia del tipo de enzima, y por los iguales motivos, la concentración de sustrato lipídico seleccionada se ha fijado en $S_0' = 63,14$ g/l de lípidos (166,67 g/l de residuo cárnico en el reactor).

Las concentraciones de enzima iniciales en el reactor (E_0') utilizadas han estado en torno a la fijada en los ensayos sobre la influencia del tipo de enzima. Ya que esta concentración era 52,44 kLU/l, el intervalo en el que se ha trabajado ha sido 17-88 kLU /l.

La duración de la hidrólisis y la agitación han sido las mismas que en los estudios previos.

Para determinar la influencia de la concentración de Resinase en la hidrólisis enzimática se realizó el seguimiento del grado de hidrólisis (GH') con el tiempo determinando, para un tiempo de 4 horas, el GH' máximo alcanzado y las cantidades de sólido no solubilizado, proteína solubilizada, colágeno en fase sólida, lípidos recuperados y ácidos grasos libres obtenidos.

Los resultados (tablas IIIB.1-IIIB.5 del Anexo III) muestran un aumento del grado de hidrólisis al aumentar la concentración de enzima que implica, a los 100 minutos de hidrólisis, el paso del GH' de un 41,48 % para 17,50 kLU/l a 95,38% para 87,44 kLU (figura 5.50). Resultados análogos han sido obtenidos por otros autores al estudiar la hidrólisis de sebo de vaca con lipasas (Mukatata et al., 1987).

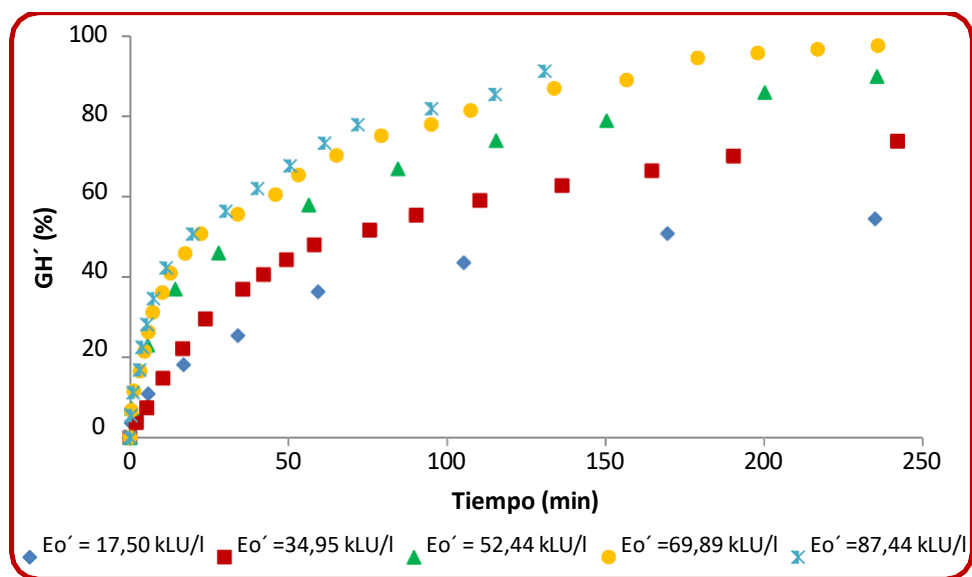


Figura 5.50.- Influencia de la concentración inicial de Resinase en el grado de hidrólisis (GH')

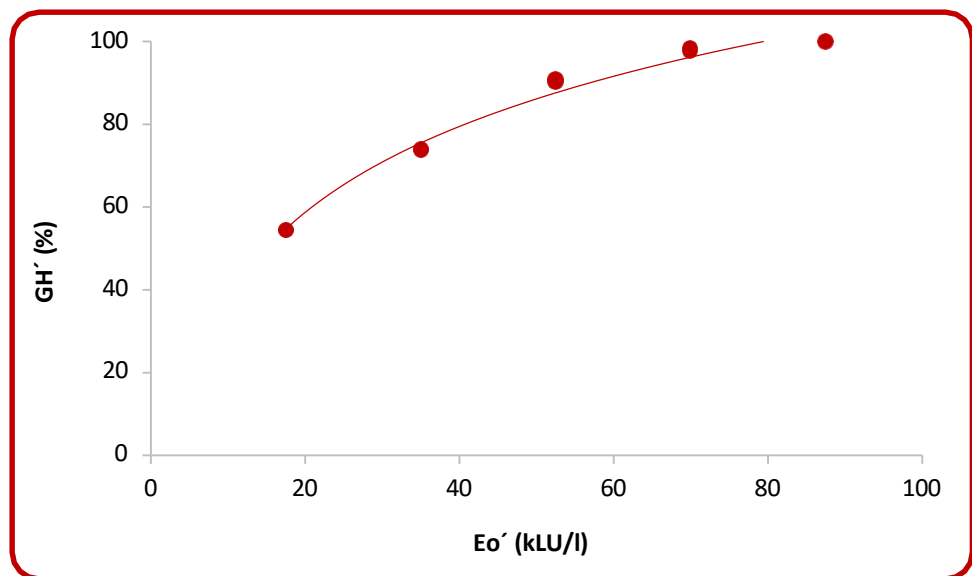


Figura 5.51.- Relación entre el grado de hidrólisis (GH') y la concentración inicial de Resinase

La evolución del grado de hidrólisis con la concentración inicial de Resinase presenta una tendencia asintótica y alcanzando el GH máximo con una concentración de enzima de 87,44 kLU/l (figura 5.51) lo que indica que se ha alcanzado la saturación con la enzima (Primožič et al., 2003). Para este nivel de enzima, un incremento adicional de la concentración de biocatalizador no aumenta la velocidad de reacción por lo que concentraciones de enzima superiores son innecesarias. Este resultado parece recomendar la utilización de concentraciones de enzima entre 70 y 80 kLU/l para evitar desembolsos económicos injustificados.

La presencia de una mayor cantidad de enzima en el reactor permite, para una misma concentración de sustrato, incrementar el número de enlaces lipasa-sustrato lipídico formados favoreciendo la ruptura de un elevado número de enlaces lipídicos lo genera un aumento en la cantidad de lípidos separados (tabla IIIB.8 del Anexo III) y en la cantidad de ácidos grasos producidos (tabla IIIB.10 del Anexo III) tendentes en ambos casos a un valor límite. No hay estudios con residuos cárnicos para confirmar este comportamiento, sin embargo, estudios realizados sobre la hidrólisis con lipasas de otro tipo de triglicéridos (en concreto, los de la grasa del queso hidrolizados con Palatase o los de aceite de soja hidrolizados con Resinase HT) también han mostrado una tendencia asintótica en el incremento de la cantidad de ácidos grasos libres obtenidos al aumentar la concentración de lipasa (Gunaratne, 1999; Dias, 2015).

Dada la relación existente entre el grado de hidrólisis y la concentración inicial de Resinase (figura 5.51), la relación entre ésta y los productos obtenidos se puede expresar a través del grado de hidrólisis.

Las figuras 5.52 y 5.53 muestran la relación directa entre el grado de hidrólisis alcanzado para diferentes concentraciones iniciales de Resinase y la cantidad de lípidos separados y de ácidos grasos totales liberados, respectivamente.

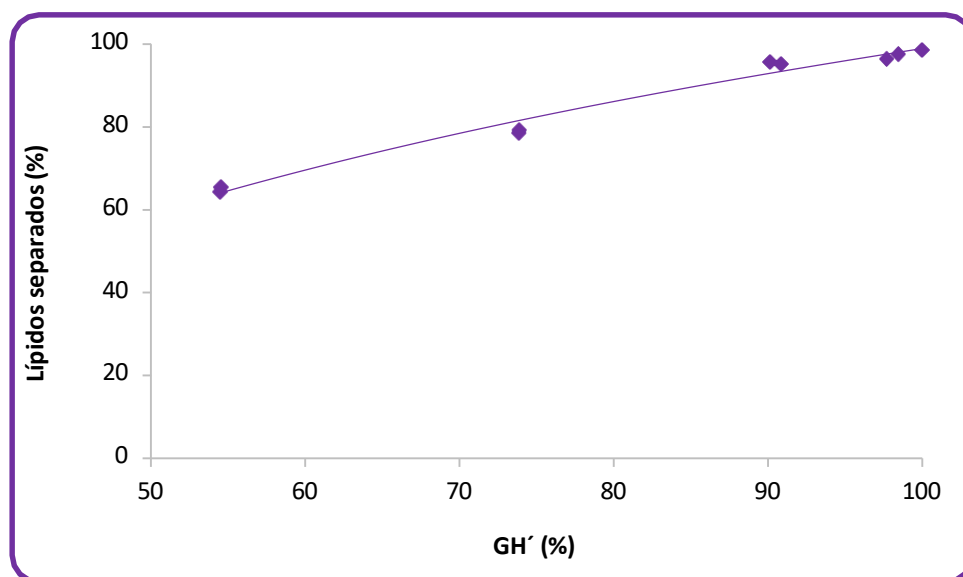


Figura 5.52.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Resinase en el porcentaje de lípidos recuperados

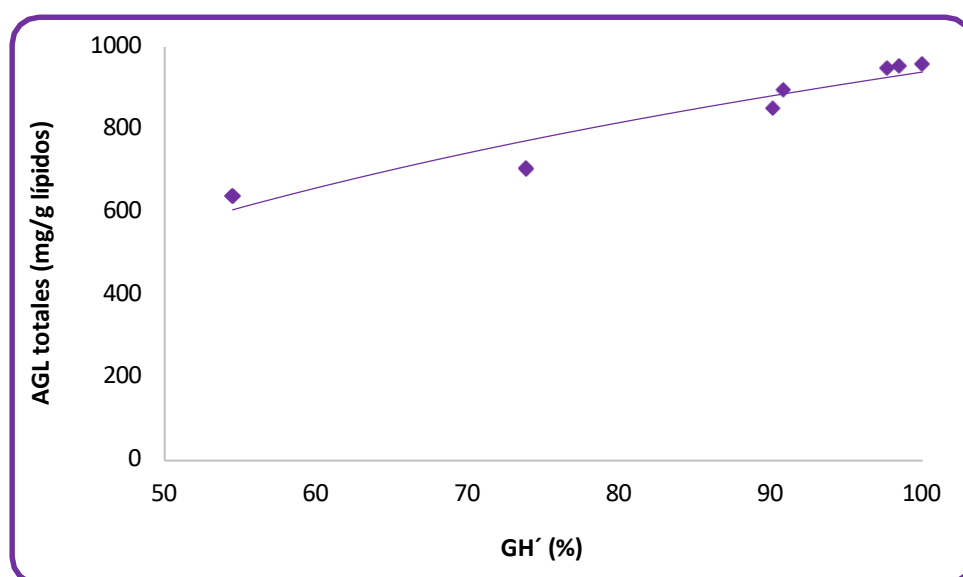


Figura 5.53.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Resinase en la cantidad total de ácidos grasos libres obtenida

Por el contrario, existe relación inversa entre la cantidad de residuo no solubilizado y la concentración inicial de Resinase utilizada en la hidrólisis (tabla IIIB.6 del Anexo III), que está justificada, como ya se ha comentado, porque el aumento de enzima favorece la hidrólisis incrementando la cantidad de hidrolizado producido

disminuyendo así la cantidad de sólido no solubilizado como consecuencia de la mayor aparición de compuestos solubilizados (tabla IIIB.7 del Anexo III). Análogamente, se puede apreciar también una relación inversa entre el grado de hidrólisis y el sólido no solubilizado (figura 5.54) o la proteína solubilizada (figura 5.55).

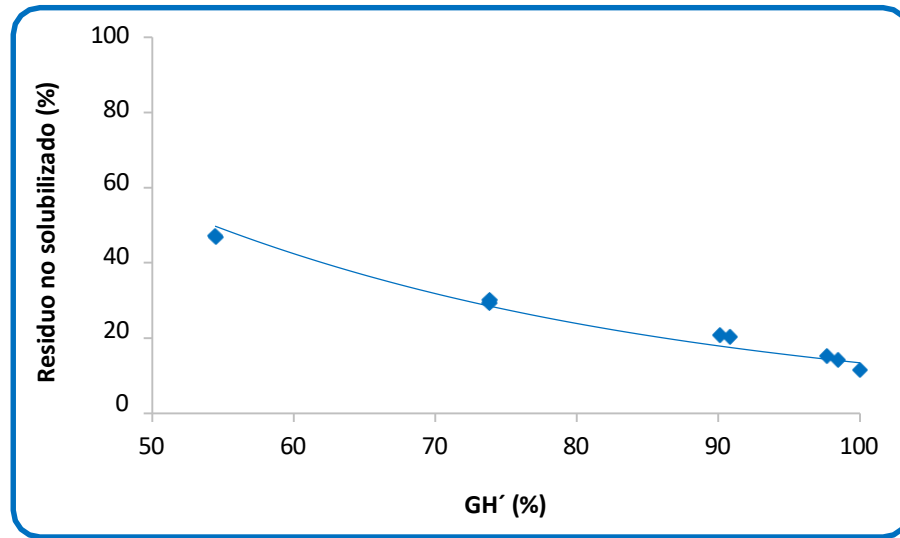


Figura 5.54.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Resinase en el porcentaje de residuo no solubilizado

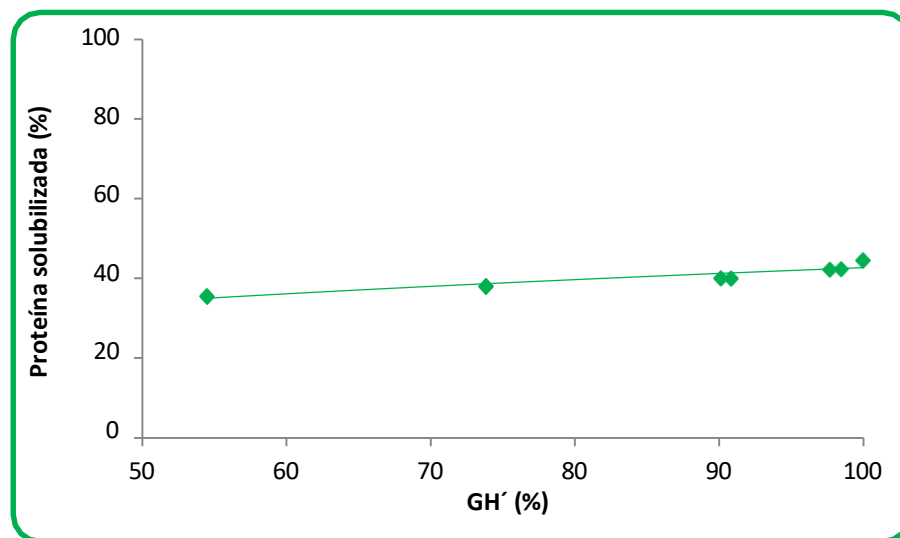


Figura 5.55.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Resinase en el porcentaje de proteína solubilizada

Un aumento en la hidrólisis de los lípidos (mayores valores de GH') favorece la liberación de la proteína presente en el residuo. La proteína liberada tiene a hidrolizarse con el agua, pero, la ausencia de proteasas en el medio hace que la hidrólisis no sea rápida por lo que el incremento de proteína solubilizada con el aumento de la concentración de lipasa no es grande.

Al igual que en el estudio anterior, los resultados del porcentaje de colágeno recuperado (tabla IIIB.8 del Anexo III) parecen indicar que éste es independiente del grado de hidrólisis alcanzado durante el proceso (figura 5.56).

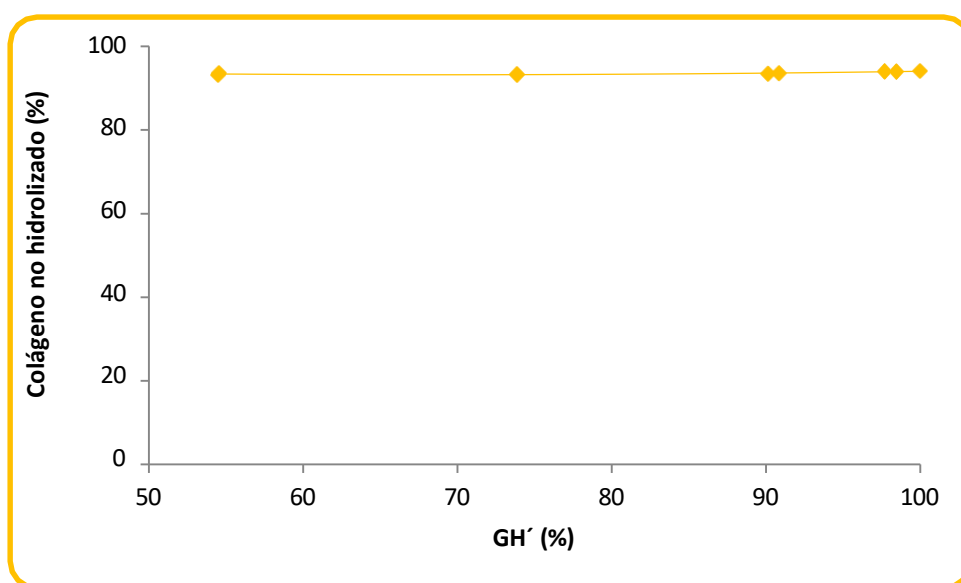


Figura 5.56.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de Resinase en el porcentaje de colágeno no hidrolizado

Como ya se indicó en el estudio de la influencia del tipo de enzima, la naturaleza fibrosa de la proteína del colágeno tiene un comportamiento diferente al de las proteínas globulares frente a la hidrólisis: éstas son más fácilmente hidrolizables dadas sus características, mientras que el colágeno es menos soluble y más difícil de hidrolizar en su estado nativo lo que hace que su hidrólisis en agua sin presencia de proteasas sea muy difícil.

5.3.3. Influencia de la concentración inicial de sustrato lipídico

En el estudio de la influencia de la concentración de sustrato lipídico en el proceso se ha utilizado la misma enzima que en el estudio de la influencia de la concentración de lipasa, la Resinase TL, por ser la que permite alcanzar el grado de hidrólisis más alto en el proceso. Las condiciones de operación en cuanto a pH, temperatura y tiempo de hidrólisis fijadas para llevar a cabo las hidrólisis han sido las mismas que en el estudio anterior con el fin de que sea posible comparar los resultados obtenidos en el proceso: pH = 8, T = 50°C, t = 240 min.

La concentración inicial de enzima utilizada ha sido la misma que en el estudio de la influencia del tipo de enzima: $Eo' = 52,44$ kLU/l.

Las concentraciones iniciales de sustrato lipídico en el reactor (So') se han fijado en torno a la utilizada en los ensayos sobre la influencia del tipo y la concentración de enzima que era de 63,14 g/l de lípidos. Por ello se ha trabajado en el intervalo de 12-116 g/l de lípidos en el reactor (30-300 g/l de residuo cárnico en el reactor). Problemas de agitación en el reactor impidieron trabajar con concentraciones más elevadas de lípidos.

Para determinar la influencia de la concentración de sustrato lipídico en la hidrólisis enzimática se realizó el seguimiento del grado de hidrólisis (GH') con el tiempo (tablas IIIC.1-IIIC.5 del Anexo III) determinando, para un tiempo de 4 horas, el GH' máximo alcanzado y las cantidades de sólido no solubilizado (tabla IIIC.6 del Anexo III), proteína solubilizada (tabla IIIC.7 del Anexo III), colágeno en fase sólida (tabla IIIC.8 del Anexo III), lípidos recuperados (tabla IIIC.9 del Anexo III) y ácidos grasos libres obtenidos (tabla IIIC.10 del Anexo III).

Los resultados obtenidos (figura 5.57) muestran cómo, al incrementar la concentración de sustrato lipídico, aumenta el grado de hidrólisis variando de un valor de 71,86 % para la concentración inicial de sustrato lipídico más baja (12,49 g/l) hasta un valor del 98,92 % para la concentración inicial de sustrato más alta (116,09 g/l). Esto representa un aumento del grado de hidrólisis próximo al 40 % al aumentar nueve veces la concentración de sustrato lipídico manteniendo la concentración inicial de lipasa constante.

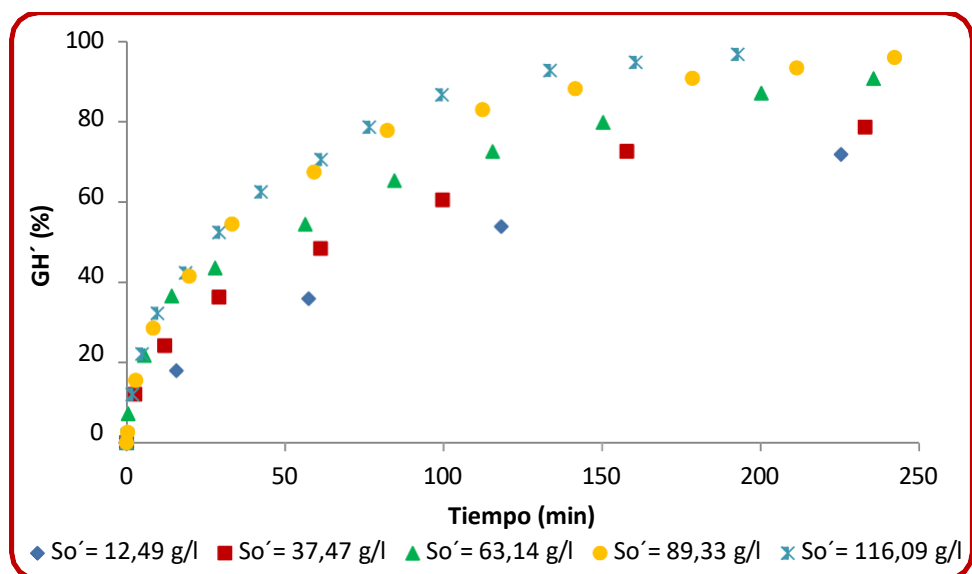


Figura 5.57.- Influencia de la concentración inicial de sustrato lipídico (So') en el grado de hidrólisis (GH')

Como se puede apreciar en este caso (figura 5.58), al contrario de lo que ocurría en la hidrólisis de la fracción proteica del residuo, los resultados son coherentes con el hecho de que, a mayor concentración de sustrato manteniendo la concentración de lipasa constante, se obtenga un mayor grado de hidrólisis, lo que parece indicar que no existe inhibición por sustrato y que la cantidad de lipasa añadida es suficiente para hidrolizar los enlaces lipídicos en todos los casos: no hay defecto de enzima como ocurría en el estudio con Alcalasa.

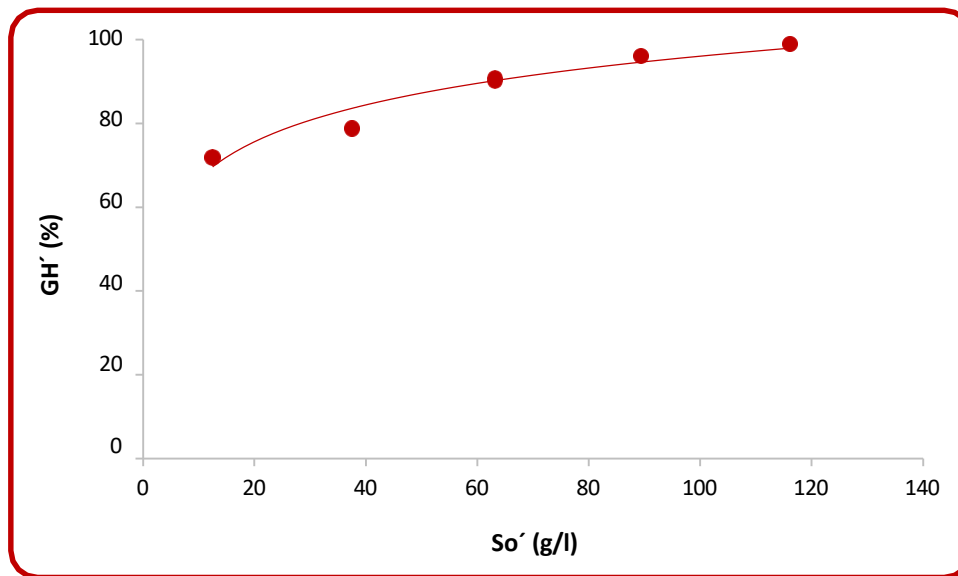


Figura 5.58.- Relación entre el grado de hidrólisis (GH') y la concentración inicial de sustrato lipídico (So')

Algunos autores como Virto et al. (1994) encontraron el efecto contrario al estudiar la hidrólisis de sebo de vaca con una lipasa procedente de la *Candida rugosa*: a mayor concentración de sustrato se obtenía menor grado de hidrólisis. La discrepancia observada con los resultados de este estudio puede deberse a varias circunstancias: a la diferente materia prima utilizada, al uso de una lipasa de un origen diferente y a que, en el estudio de Virto et al., no analizaron la influencia de la relación concentración de enzima/concentración de sustrato por lo que es posible que, para determinadas concentraciones de sebo, la cantidad de lipasa añadida no fuera suficiente.

Sin embargo, el aumento de la pendiente de las curvas de hidrólisis en los primeros minutos de hidrólisis (velocidad de reacción) con el incremento de la concentración de sustrato lipídico obtenido en nuestra investigación (figura 5.57) sí que ha sido observado también por otros autores en estudios realizados sobre hidrólisis de lípidos con lipasas (Jamie et al., 2017).

Como consecuencia del incremento del grado de hidrólisis obtenido al incrementarse la concentración de sustrato lipídico, el porcentaje de lípidos recuperados aumenta (figura 5.59) y también lo hace la cantidad de ácidos grasos totales liberados (figura 5.60). Este mismo resultado ha sido observado también por Sharma et al. (2013) en la hidrólisis del aceite de hígado de bacalao con una lipasa procedente de la *Candida*

cylindracea. No hay referencias bibliográficas sobre la relación entre So' y los ácidos grasos totales liberados por hidrólisis con lipasas en el caso de residuos cárnicos o grasas animales.

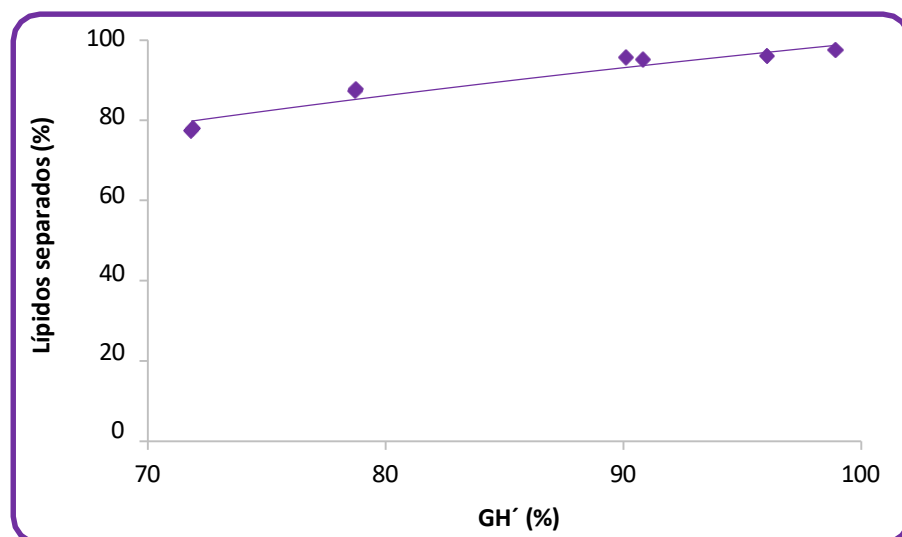


Figura 5.59.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato lipídico en el porcentaje de lípidos recuperados

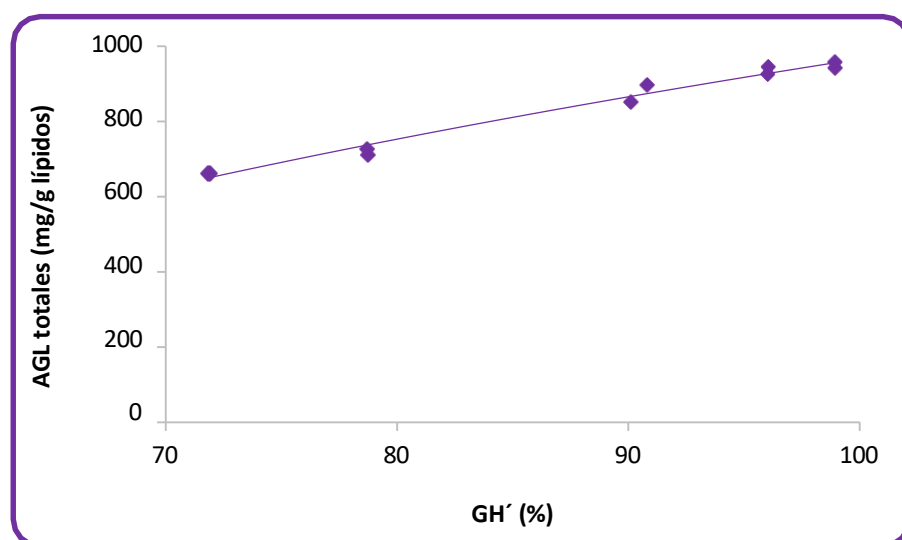


Figura 5.60.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato lipídico en la cantidad total de ácidos grasos libres obtenida

Asimismo, aumenta ligeramente el porcentaje de proteína solubilizada (figura 5.61) al ser liberada tras la hidrólisis de los enlaces lipídicos y parcialmente hidrolizada por el agua del medio, manteniéndose constante el porcentaje de colágeno hidrolizado (figura 5.62), igual que en los casos anteriores, por su mayor dificultad a ser hidrolizado. Como consecuencia de un aumento de lípidos hidrolizados y proteína solubilizada, el porcentaje de residuo que permanece inalterado, residuo no solubilizado, disminuye al aumentar el grado de hidrólisis (figura 5.63).

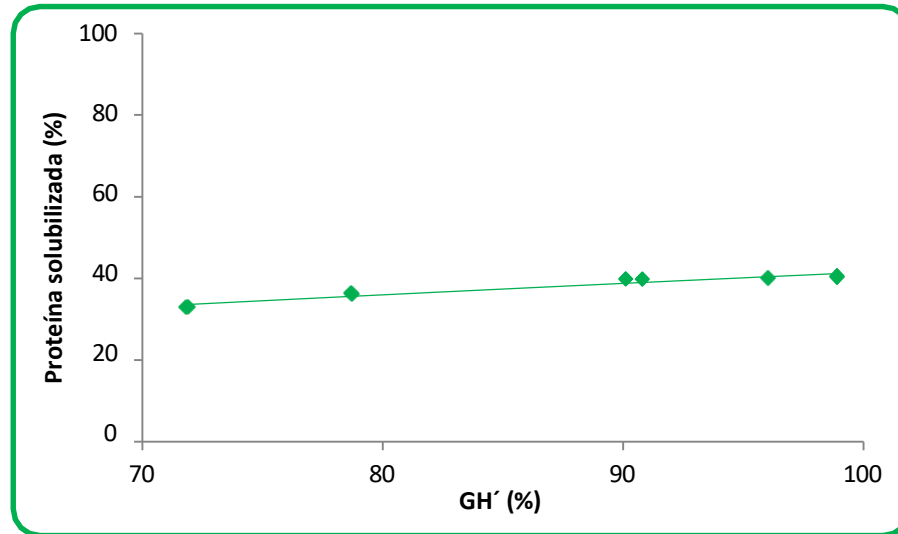


Figura 5.61.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato lipídico en el porcentaje de proteína solubilizada

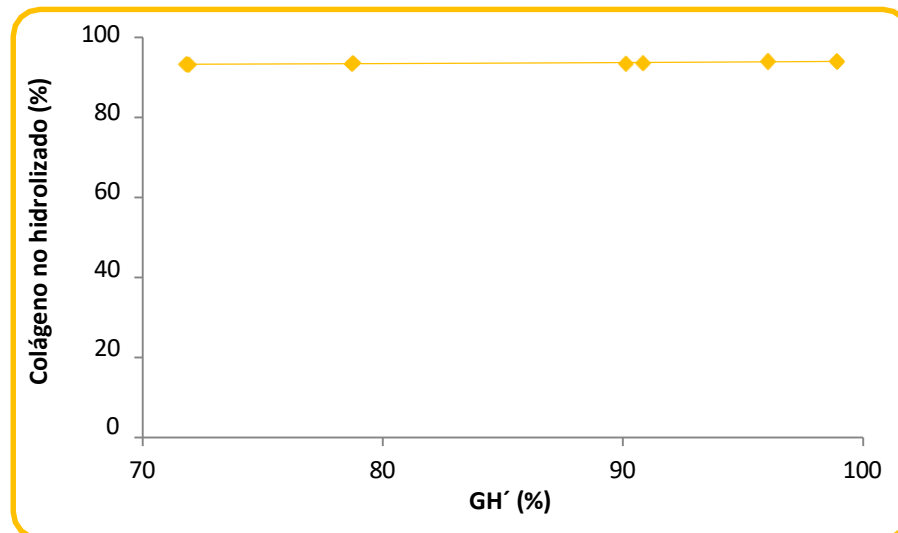


Figura 5.62.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato lipídico en el porcentaje de colágeno no hidrolizado

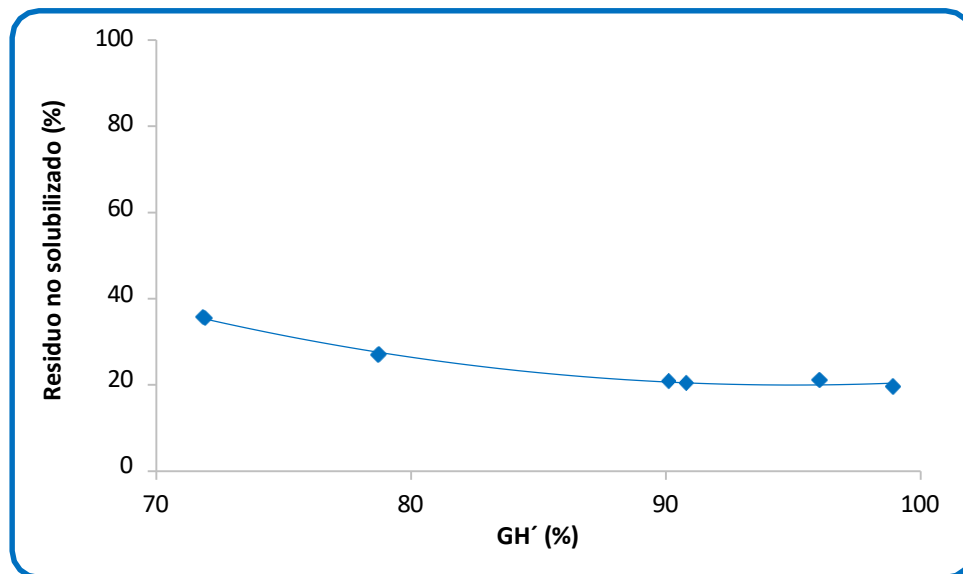


Figura 5.63.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas concentraciones iniciales de sustrato lipídico en el porcentaje de residuo no solubilizado

5.3.4. Influencia de la relación concentración inicial de lipasa / concentración inicial de sustrato lipídico

Si bien con la Resinasa no se han observado resultados diferentes a los previstos en los estudios por separado sobre la influencia de la concentración inicial de lipasa (Eo') y de sustrato lipídico (So'), con el fin de realizar un análisis sistemático que permita determinar si también en este caso se puede sustituir la influencia independiente de Eo' y So' por la relación entre la concentración inicial de lipasa y la concentración inicial de sustrato lipídico (Eo'/So'), se llevó a cabo la determinación de la influencia de este parámetro sobre la obtención de subproductos de mayor valor añadido.

Al igual que en los apartados previos, la lipasa seleccionada para hacer este estudio ha sido la Resinase TL. También se han mantenido las mismas condiciones de operación de pH, temperatura y tiempo de hidrólisis que en los apartados anteriores: pH = 8, T = 50°C y t = 240 min.

En este caso lo que se ha variado ha sido la relación Eo'/So' en un intervalo de valores entre 0,28 y 1,19 kLU/g.

Igual que en todos los demás estudios, para determinar la influencia de la relación Eo'/So' en la hidrólisis enzimática se realizó el seguimiento del grado de hidrólisis (GH') con el tiempo determinando, para un tiempo de 4 horas, el GH' máximo alcanzado y las cantidades de sólido no solubilizado, proteína solubilizada, colágeno en fase sólida, lípidos recuperados y ácidos grasos.

A partir de los resultados obtenidos (tablas IIID.1-IIID.7 del Anexo III) se aprecia cómo aumenta el grado de hidrólisis al aumentar Eo'/So' indicando una mayor ruptura de enlaces lipídicos al incrementar la cantidad relativa de enzima en relación con la de sustrato ya que se genera un mayor número de puntos activos enlazados entre la Resinase y la fracción lipídica del residuo cárnico (figuras 5.64 y 5.65).

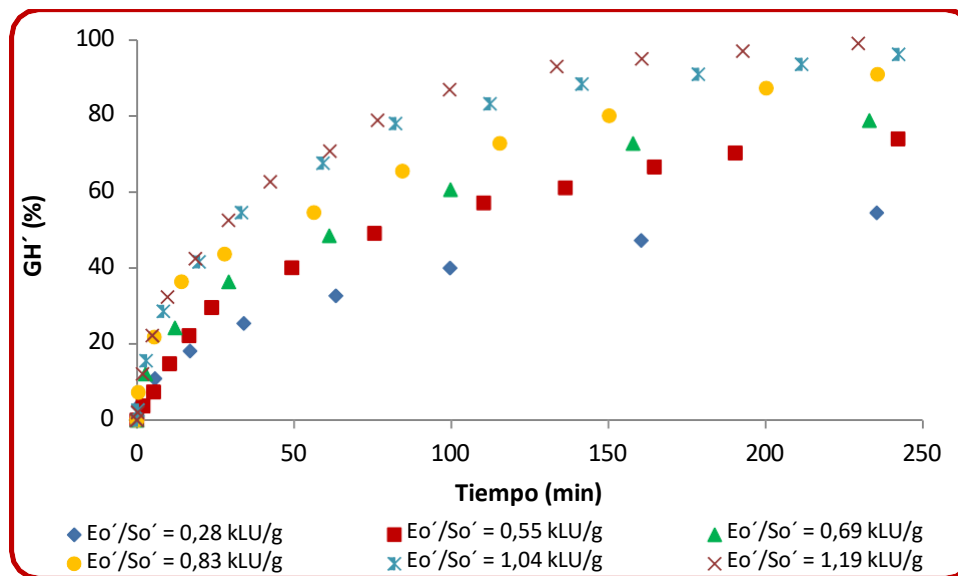


Figura 5.64.- Influencia de la relación entre concentración inicial de Resinase y la concentración inicial de sustrato lipídico (Eo'/So') en el grado de hidrólisis (GH')

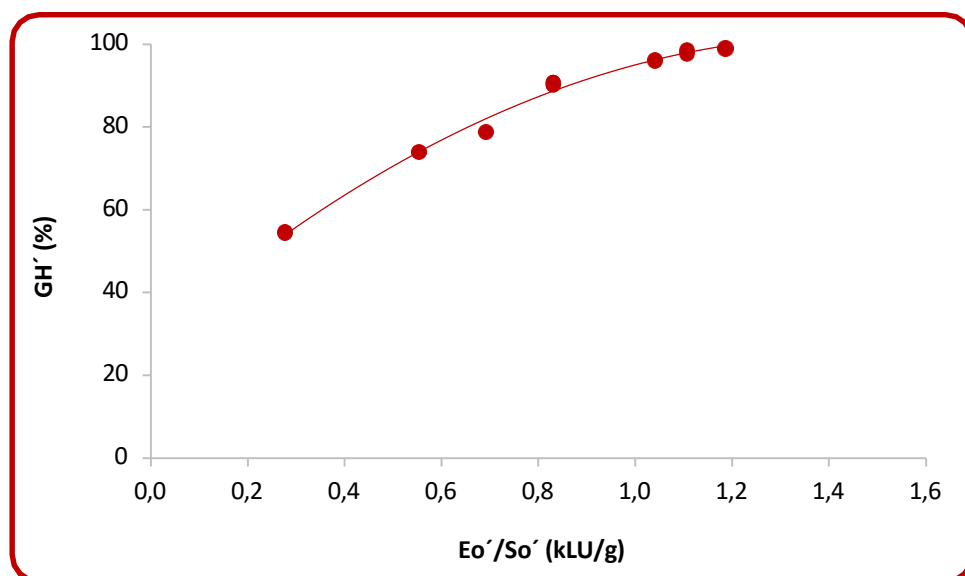


Figura 5.65.- Relación entre Eo'/So' y el grado de hidrólisis (GH')

Del mismo modo, se puede observar cómo el parámetro Eo'/So' (o el GH' ya que, como se acaba de ver, están estrechamente relacionados) presenta una relación directa con la cantidad de lípidos recuperados y proteína solubilizada e inversa con la cantidad de sólido no solubilizado mientras que la cantidad de colágeno recuperada no está influida por este parámetro (tablas IID.8-IID.11 del Anexo III y figuras 5.66-5.69). La explicación de estos resultados es idéntica a la indicada en el apartado 5.3.1.

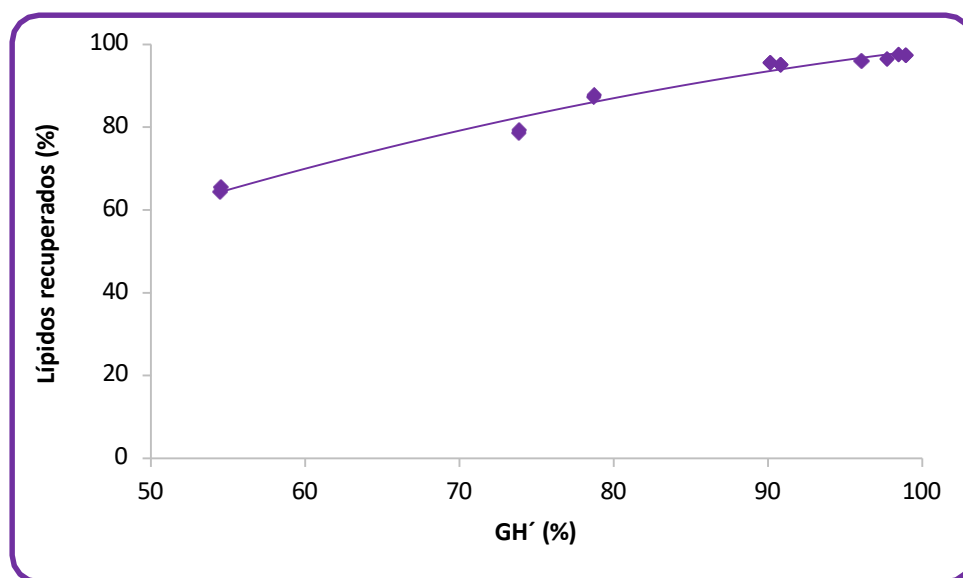


Figura 5.66.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas relaciones Eo'/So' en el porcentaje de lípidos recuperados

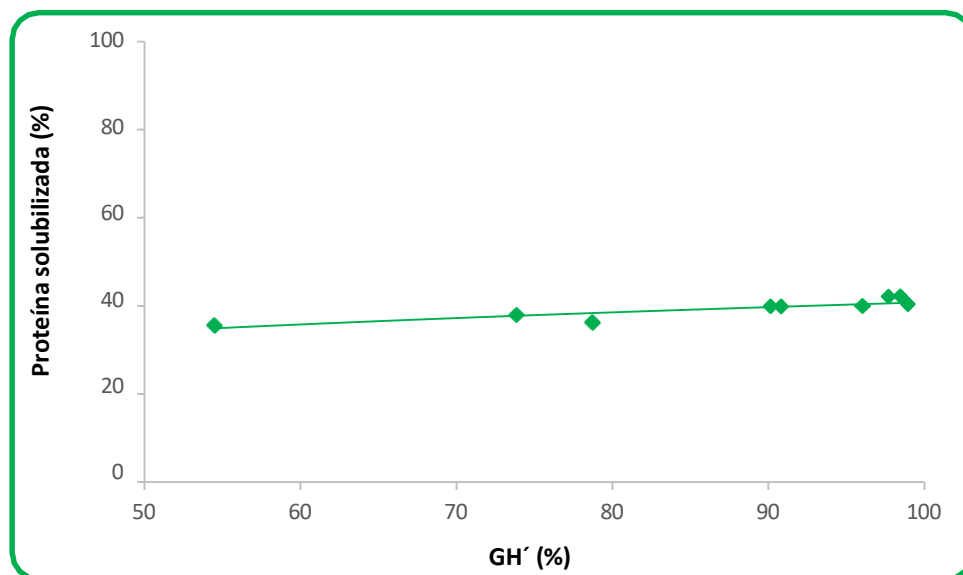


Figura 5.67.- Influencia del grado de hidrólisis (GH) alcanzado con distintas relaciones Eo'/So' en el porcentaje de proteína solubilizada

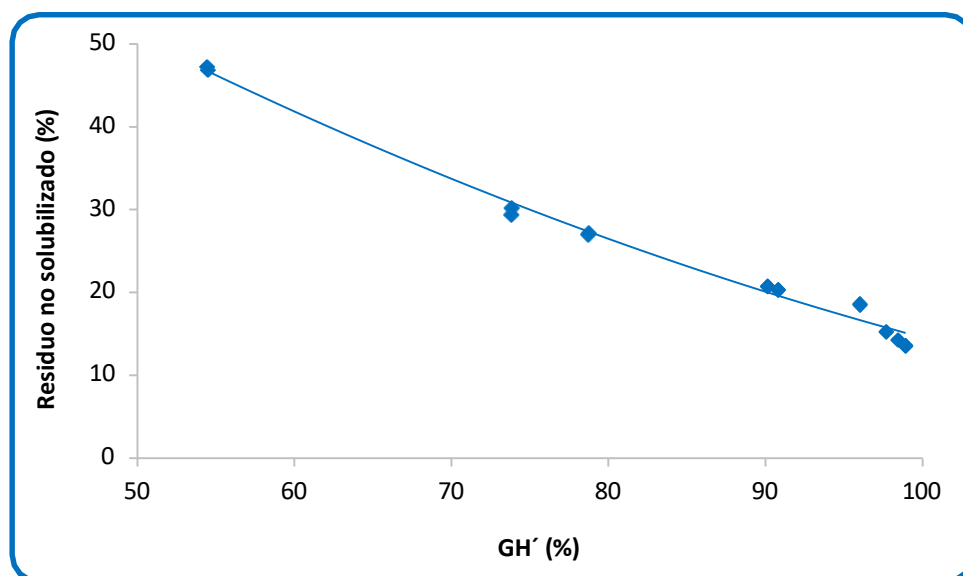


Figura 5.68.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas relaciones Eo'/So' en el porcentaje de residuo no solubilizado

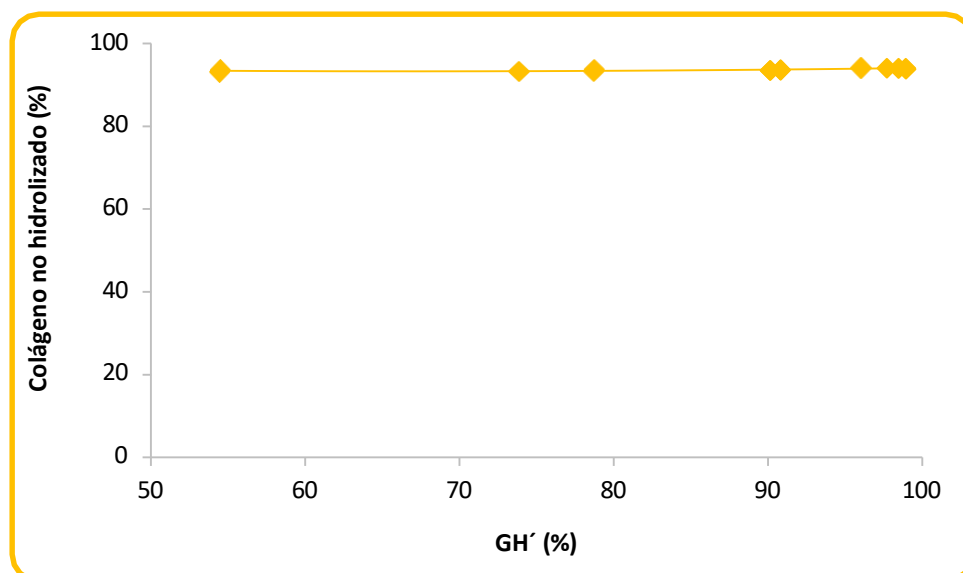


Figura 5.69.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas relaciones Eo'/So' en el porcentaje de colágeno no hidrolizado

De acuerdo con estos resultados, para recuperar mayores porcentajes de lípidos o proteína solubilizada, deberán utilizarse relaciones de Eo'/So' altas mientras que la relación Eo'/So' no influye en el porcentaje de recuperación de colágeno.

No hay estudios previos en la bibliografía sobre la influencia de la relación entre la concentración inicial de lipasa y la concentración inicial de sustrato lipídico en la hidrólisis de lípidos, sin embargo, a partir de la investigación realizada queda patente esta influencia. Y también queda patente la relación entre el grado de hidrólisis alcanzado y los productos obtenidos.

Esta relación también se apreció en la cantidad de ácidos grasos obtenida. En la tabla IIID.12 del Anexo III se puede observar esa cantidad para las distintas relaciones Eo'/So' ensayadas. Se aprecia cómo aumenta la cantidad de ácidos grasos individuales con la relación enzima/sustrato. Dias (2015) observó el mismo fenómeno en la hidrólisis de aceite de soja con diferentes lipasas, entre ellas, la Resinase HT.

Comparando los GH' obtenidos para las distintas relaciones Eo'/So' con las cantidades de cada ácido producidas también se observa una relación directa: a mayor GH', mayor cantidad de ácido producido. Como ya se indicó anteriormente, esta relación es lógica ya que el GH' es calculado como la relación entre ácidos grasos libres separados y ácidos grasos libres en la muestra (Avelar *et al.*, 2013). Lencki *et al.* (1998) también encontraron una mayor producción de cantidad de ácidos grasos individuales al aumentar el grado de hidrólisis de la mantequilla de vaca hidrolizada con una lipasa del *Penicillium roqueforti*.

Las figuras 5.70 y 5.71 muestran las cantidades medias obtenidas de los diferentes ácidos grasos (AGL) para los GH' medios alcanzados con las diferentes relaciones Eo'/So' ensayadas.

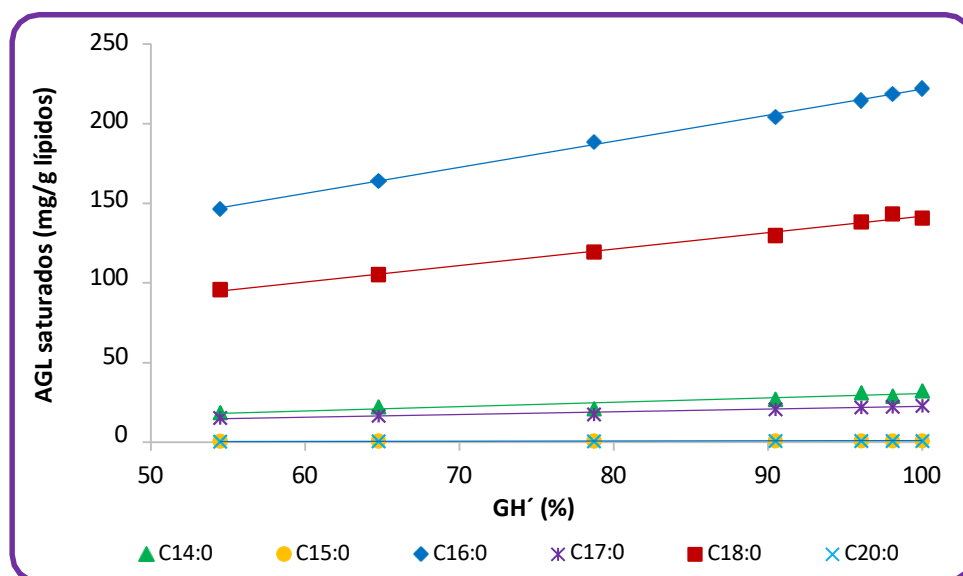


Figura 5.70.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas relaciones Eo'/So' en la cantidad de ácidos grasos saturados liberados

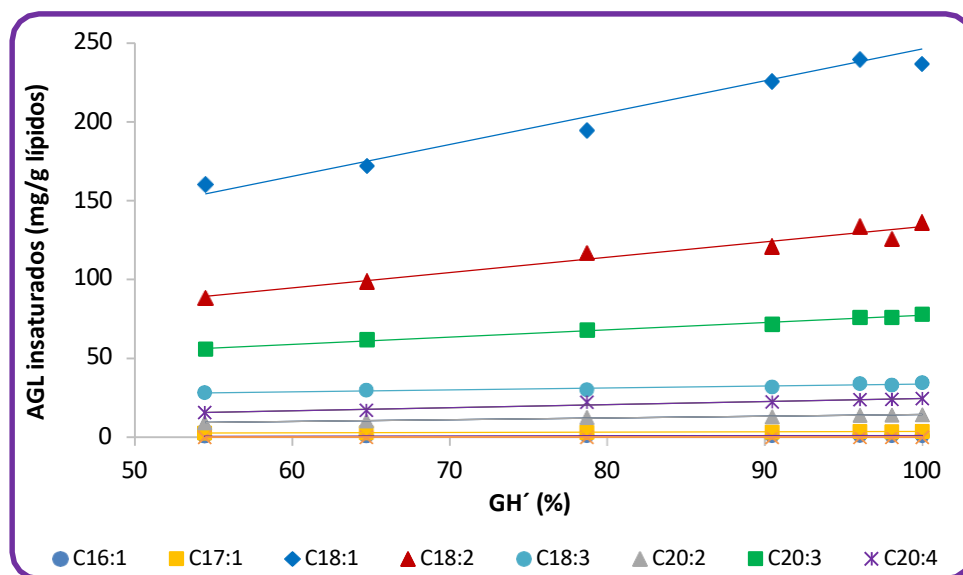


Figura 5.71.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas relaciones Eo'/So' en la cantidad de ácidos grasos insaturados liberados

De esas figuras se deduce que existe una dependencia lineal entre la cantidad de ácidos grasos liberados y el grado de hidrólisis que puede expresarse a partir de una expresión del tipo:

$$AGL = a \ GH' + b \quad \text{Ec. 5.35}$$

Los valores de los coeficientes a y b obtenidos, así como el correspondiente coeficiente de regresión (R^2), aparecen recogidos en la tabla 5.22.

Tabla 5.22.- Ajuste lineal de cada ácido graso liberado en la hidrólisis con Resinase

Ácido graso	a	b	R ²
C14:0	0,27	3,21	0,96
C15:0	0,01	0,43	0,95
C16:0	1,64	58,06	1,00
C16:1	0,01	0,36	0,99
C17:0	0,17	5,71	0,96
C17:1	0,02	1,52	0,98
C18:0	1,033	38,749	0,99
C18:1	2,01	44,69	0,95
C18:2	0,97	36,76	0,95
C18:3	0,13	21,20	0,99
C20:0	0,01	0,19	0,99
C20:2	0,11	3,67	0,98
C20:3	0,46	31,39	0,99
C20:4	0,1941	5,2996	0,95

En la figura 5.72 se encuentran representados los ácidos grasos liberados agrupados en función del número de dobles enlaces que poseen: saturados (sin dobles enlaces), monoinsaturados (un doble enlace) y poliinsaturados (varios dobles enlaces). En dicha figura se puede apreciar que los tres tipos de ácidos grasos presentan una dependencia lineal con el grado de hidrólisis y, como consecuencia, con la relación lipasa/sustrato lipídico. Los ácidos grasos saturados resultan ser mayoritarios si se

comparan con los monoinsaturados y los poliinsaturados por separado pero, si la comparación se realiza entre ácidos grasos saturados e insaturados (incluyendo mono y poliinsaturados), los ácidos grasos insaturados son predominantes. Este resultado es coherente con la composición en ácidos grasos de la fracción lipídica de los residuos cárnicos utilizados (tabla I.7 del Anexo I) en la cual, los ácidos grasos saturados representan el mayor porcentaje (46,64 %) seguido de los ácidos poliinsaturados (28.09 %) y de los monoinsaturados (25,27 %). Esta recuperación de los ácidos grasos en función de la composición inicial existente en la materia prima hidrolizada fue observada también por Morales-Medina et al. (2018) al hidrolizar aceite de sardina con diferentes enzimas lipolíticas como Lipozyme RM IM (una lipasa procedente del *Rhizomucor miehei*) y Novozyme 435 (una lipasa procedente de la *Candida antártica*).

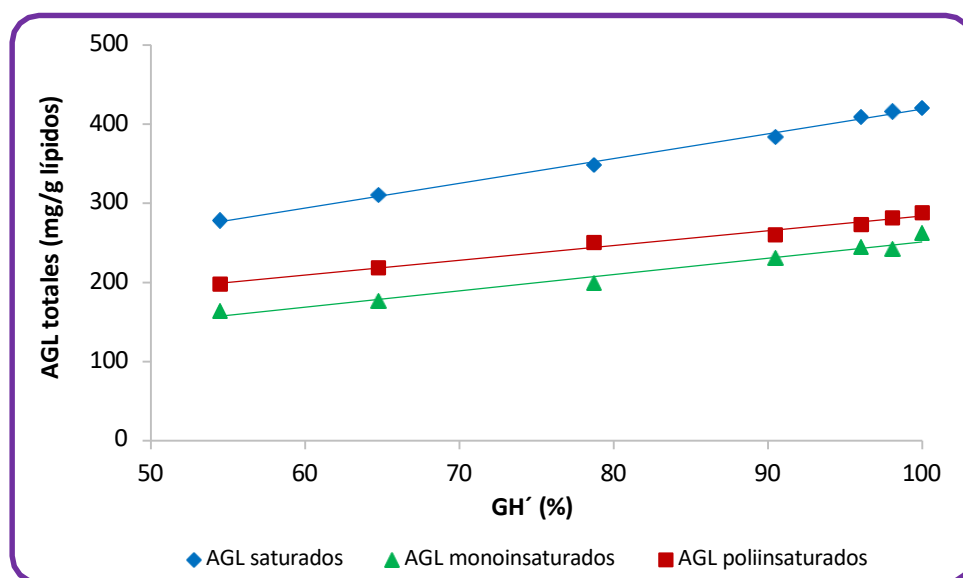


Figura 5.72.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas relaciones Eo'/So' en la cantidad de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados liberados

A partir de un grado de hidrólisis del 90 %, el incremento en las cantidades de ácidos grasos liberados no es notable: el máximo incremento corresponde al C16:0 y es tan solo de un 8%, siendo para el resto de los ácidos liberados muy inferior. Ello sugiere trabajar con relaciones Eo'/So' en torno a 0,83 kLU/g para no encarecer innecesariamente el proceso.

5.3.5. Influencia del pH y la temperatura en la hidrólisis lipídica

También en este caso, la lipasa seleccionada para hacer el estudio de la influencia del pH y la temperatura en el proceso ha sido la Resinase TL. La duración de las hidrólisis se ha mantenido en 240 min y se han utilizado como concentraciones iniciales de lipasa y sustrato lipídico en el reactor los valores medios empleados en los estudios anteriores: 52,44 kLU /l y 63,14 g/l, respectivamente.

Los experimentos se han llevado a cabo con valores de pH y temperatura alrededor de los valores utilizados anteriormente: para el pH entre 7,0 y 9,0 trabajando a una temperatura de 50°C, y para la temperatura entre 40 y 60°C trabajando a un pH de 8,0.

Para determinar la influencia del pH y la temperatura en la hidrólisis enzimática se realizó el seguimiento del grado de hidrólisis (GH') con el tiempo determinando, para un tiempo de 4 horas, el GH' máximo alcanzado y las cantidades de sólido no solubilizado, proteína solubilizada, colágeno en fase sólida, lípidos recuperados y ácidos grasos.

En la figura 5.73 aparece reflejada la evolución del grado de hidrólisis con el tiempo para distintos pH (tablas IIIE.1-III E.5 del Anexo III). En ella se observa cómo el GH' varía entre un 69 % para un pH de 7,0 hasta un 98 % para un pH de 9,0. La tendencia asintótica de esta evolución (figura 5.74) sugiere que trabajar con pH superiores a 8,5 no implica una mejora significativa en el proceso de hidrólisis de los lípidos.

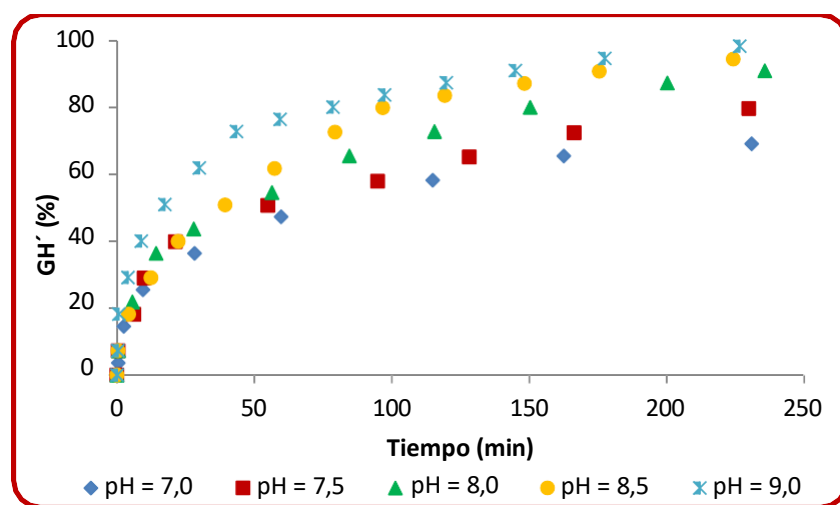


Figura 5.73.- Influencia del pH en el grado de hidrólisis alcanzado con Resinase (GH')

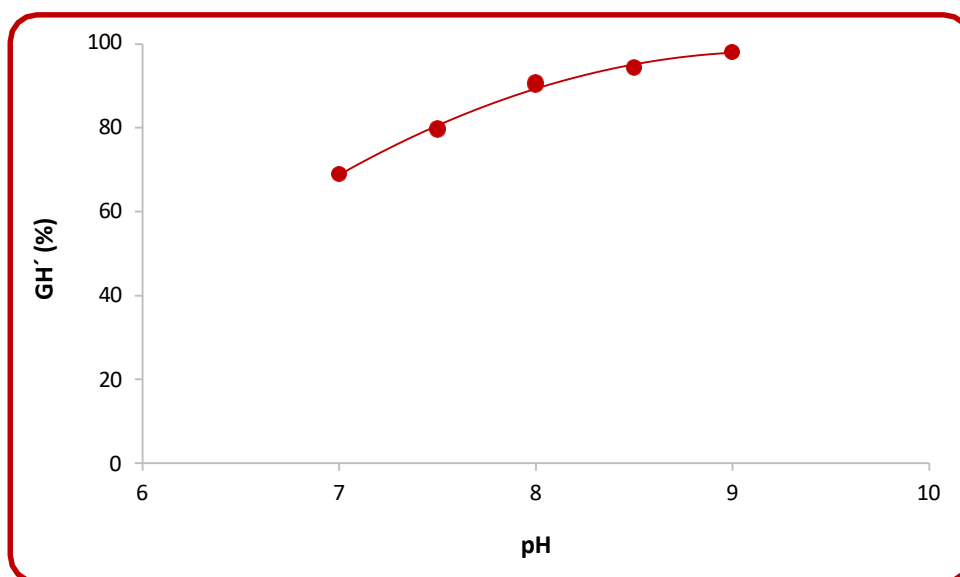


Figura 5.74.- Relación entre el grado de hidrólisis (GH') y el pH

La figura 5.75, en la que se muestra la evolución del grado de hidrólisis con el tiempo para distintas temperaturas (tablas III F.1-III F.5 del Anexo III), indica que los grados de hidrólisis finales alcanzados son relativamente próximos entre sí en el intervalo de 40 a 55°C mientras que, para 60°C, el grado de hidrólisis se reduce notablemente. Esto sugiere que no se debe llevar a cabo la hidrólisis lipolítica a temperaturas superiores a 55°C.

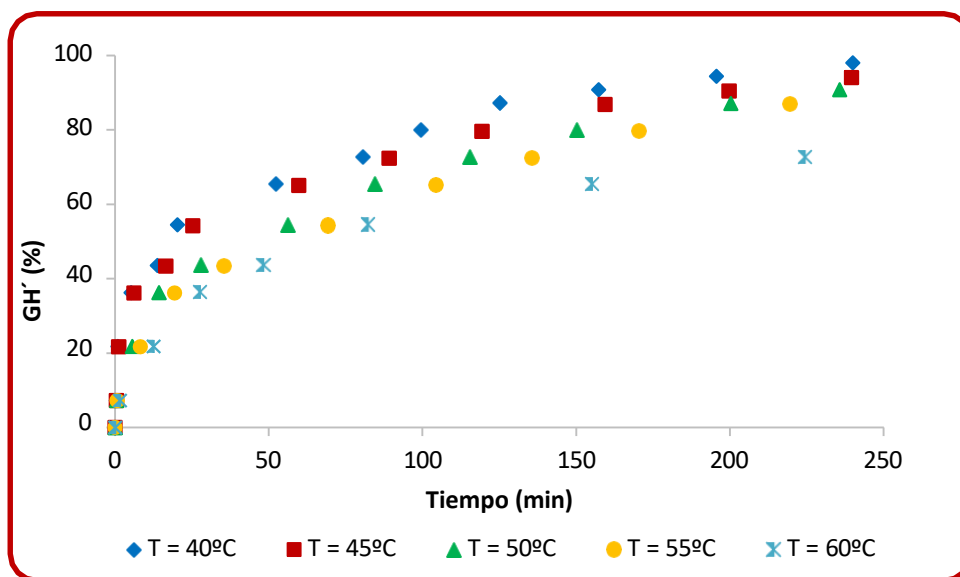


Figura 5.75.- Influencia de la temperatura en el grado de hidrólisis alcanzado con Resinase (GH')

El comportamiento frente al pH está justificado por la gran estabilidad de la enzima en el intervalo de pH utilizado (Andrade et al., 2017) y, aunque la bibliografía indica que la Resinase es activa a temperaturas de hasta 90°C, se ha comprobado que, en presencia del residuo, se produce desactivación con el tiempo al aumentar la temperatura y esa desactivación es tan elevada a temperaturas más altas que la eficacia del proceso es menor a 60°C dado el largo tiempo que se mantiene la reacción.

Los resultados alcanzados en la obtención de subproductos (tablas 5.23 y 5.24) indican que, la recuperación de lípidos y la solubilización de proteínas se ven favorecidas por la reducción de la temperatura o por el incremento del pH, aunque los valores más adecuados parecen estar en torno a un pH de 8,0 ya que, para pHs más altos, no hay variaciones significativas en los porcentajes de subproductos recuperados que justifiquen su empleo. Por otra parte, la recuperación de colágeno en presencia de lipasas parece independiente de las condiciones de operación de pH y temperatura. La justificación de estos resultados está dada por la relación entre el GH' y el porcentaje de subproductos recuperados que ya se explicó en los apartados anteriores.

Tabla 5.23.- Relación entre los parámetros determinados y el pH en la hidrólisis con Resinase

pH	GH (%)	Lípidos recuperados¹ (%)	Residuo no solubilizado² (%)	Proteína solubilizada³ (%)	Colágeno no hidrolizado⁴ (%)
7,0	68,96±0,08	77,36±0,01	25,87±0,13	37,87±0,05	93,70±0,12
7,5	79,72±0,30	91,31±0,12	24,60±0,10	38,79±0,04	93,17±0,02
8,0	90,46±0,48	95,40±0,33	20,54±0,29	39,96±0,02	93,60±0,09
8,5	94,35±0,15	96,45±0,08	14,92±0,10	42,76±0,12	93,27±0,04
9,0	98,08±0,04	97,68±0,02	11,32±0,06	43,80±0,03	93,26±0,01

¹Tabla III.E.9 del Anexo III, ²Tabla III.E.6 del Anexo III, ³Tabla III.E.7 del Anexo III, ⁴Tabla III.E.8 del Anexo III

Tabla 5.24.- Relación entre los parámetros determinados y la temperatura (T) en la hidrólisis con Resinase

T (°C)	GH (%)	Lípidos recuperados¹ (%)	Residuo no solubilizado² (%)	Proteína solubilizada³ (%)	Colágeno no hidrolizado⁴ (%)
40	97,94±0,21	98,89±0,05	10,82±0,07	41,76±0,14	93,28±0,01
45	94,26±0,30	97,29±0,06	14,23±0,40	40,67±0,03	93,15±0,03
50	90,46±0,48	95,39±0,34	20,54±0,29	39,92±0,07	93,44±0,13
55	86,85±0,04	87,01±0,01	23,07±0,05	37,98±0,02	92,91±0,02
60	72,65±0,04	68,12±0,10	25,72±0,03	36,53±0,02	93,16±0,02

¹Tabla III.F.9 del Anexo III, ²Tabla III.F.6 del Anexo III, ³Tabla III.F.7 del Anexo III, ⁴Tabla III.F.8 del Anexo III

La comparativa entre las cantidades de ácidos grasos liberados en función del pH y la temperatura (tablas III.E.10 y III.F.10 del Anexo III) se recoge en las tablas 5.25 y 5.26. En ellas se puede apreciar que siguen la misma tendencia que el GH': a mayor pH y menor temperatura, mayor cantidad de ácidos individuales obtenidos. La influencia del pH y la temperatura en la cantidad de ácidos grasos liberados en la hidrólisis de lípidos también ha sido observada por otros investigadores (Gunaratne, 1999).

Tabla 5.25.- Cantidades de ácidos grasos obtenidas (mg_{ácido}/g_{lípidos}) con Resinase para distintos pHs

Ácido graso	pH				
	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
C14:0	20,17±0,12	23,14±0,50	27,08±1,14	28,23±1,26	29,82±0,02
C15:0	0,76±0,00	0,91±0,01	0,97±0,04	0,99±0,03	1,02±0,03
C16:0	171,00±0,05	186,10±0,29	204,22±8,54	212,69±3,56	215,47±1,03
C16:1	1,02±0,01	1,08±0,05	1,07±0,00	1,09±0,02	1,15±0,00
C17:0	17,29±0,20	18,97±0,63	20,80±0,95	22,00±0,13	22,53±0,10
C17:1	2,89±0,06	3,05±0,13	3,40±0,13	3,74±0,01	3,84±0,03
C18:0	101,72±2,49	116,64±1,72	129,86±5,47	135,69±0,09	140,49±0,38
C18:1	183,71±2,21	195,39±3,98	225,59±7,82	231,68±0,17	234,26±1,15
C18:2	86,15±0,92	101,76±0,88	121,08±5,10	126,66±0,17	131,24±0,60
C18:3n3	28,79±0,15	30,28±0,13	30,80±1,10	32,40±0,05	33,04±0,17
C18:3n6	1,07±0,03	1,15±0,03	1,09±0,04	1,21±0,06	1,17±0,04
C20:0	0,85±0,01	0,92±0,05	0,99±0,03	1,07±0,01	1,13±0,01
C20:2	10,57±0,04	11,48±0,29	13,09±0,53	13,45±0,03	13,70±0,08
C20:3n3	24,05±0,03	25,48±0,69	29,42±1,07	30,64±0,03	31,44±0,12
C20:3n6+C21:0	37,45±0,11	39,88±0,10	42,24±0,08	43,05±0,04	43,74±0,13
C20:4n6	17,55±0,41	19,64±0,06	22,46±0,96	23,09±0,07	23,58±0,10
AGS	311,79±2,23	346,68±3,09	383,92±1,18	400,65±2,37	410,46±1,50
AGI	393,26±2,63	429,19±4,00	490,39±1,61	507,05±0,26	517,17±0,83

AGS: Ácidos grasos saturados

AGI: Ácidos grasos insaturados

Tabla 5.26.- Cantidades de ácidos grasos obtenidas (mg_{ácido}/gl_{lípidos}) con Resinase para distintas temperaturas

Ácido graso	Temperatura (°C)				
	40	45	50	55	60
C14:0	28,26±0,43	27,36±1,01	27,08±1,14	26,70±0,41	24,55±0,72
C15:0	1,10±0,03	1,05±0,03	0,97±0,04	0,90±0,04	0,65±0,01
C16:0	230,67±1,21	216,64±4,08	204,22±8,54	189,61±4,45	149,47±0,55
C16:1	1,19±0,01	1,13±0,03	1,07±0,00	1,03±0,05	0,83±0,01
C17:0	23,14±0,09	22,07±0,59	20,80±0,95	20,03±0,52	15,32±0,07
C17:1	4,19±0,01	3,75±0,24	3,40±0,13	2,96±0,08	2,01±0,04
C18:0	143,01±0,90	135,78±1,00	129,86±5,47	125,41±0,55	97,31±0,59
C18:1	233,49±2,65	230,18±0,13	225,59±7,82	215,25±4,58	192,38±4,25
C18:2	135,57±1,70	127,44±0,13	121,08±5,10	114,50±1,80	85,30±0,03
C18:3n3	40,50±0,05	35,89±1,23	30,80±1,10	27,14±0,75	11,72±0,69
C18:3n6	1,19±0,02	1,16±0,01	1,09±0,04	1,11±0,06	0,94±0,02
C20:0	1,13±0,01	1,02±0,03	0,99±0,03	0,90±0,01	0,70±0,00
C20:2	14,11±0,06	13,61±0,22	13,09±0,53	12,67±0,01	10,13±0,22
C20:3n3	33,10±0,16	31,69±0,26	29,42±1,07	28,04±0,07	21,45±0,13
C20:3n6+C21:0	43,88±0,16	43,36±0,60	42,24±0,08	39,43±1,19	31,71±0,18
C20:4n6	24,98±0,47	23,50±0,01	22,46±0,96	20,62±0,21	13,46±0,07
AGS	427,30±1,60	403,92±4,79	383,92±1,68	363,55±3,03	288,00±0,84
AGI	532,21±4,18	511,71±2,05	490,24±4,57	462,75±6,73	369,90±4,33

AGS: Ácidos grasos saturados

AGI: Ácidos grasos insaturados

La representación de la cantidad total de ácidos grasos liberados frente al grado de hidrólisis obtenido para los distintos pHs (figura 5.76) y las diferentes temperaturas (figura 5.77) permite apreciar claramente cómo, para GH' superiores al 90 % (pH superior a 8,0 a 50°C o temperaturas superiores a 50°C a pH 8,0) no hay variaciones significativas en las cantidades de ácidos obtenidas que justifiquen el coste adicional de alcanzar grados de hidrólisis más altos.

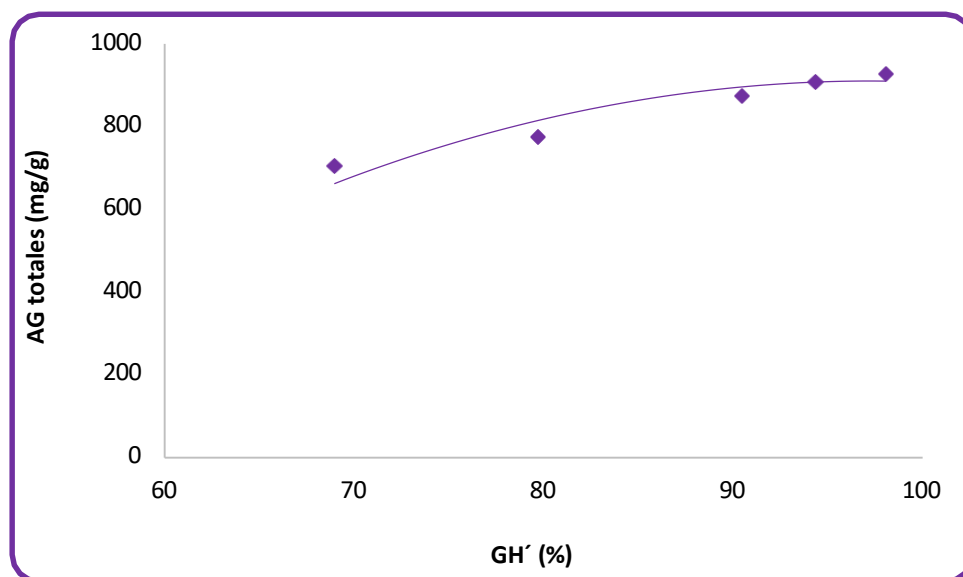


Figura 5.76.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintos pHs en la cantidad total de ácidos grasos libres obtenida

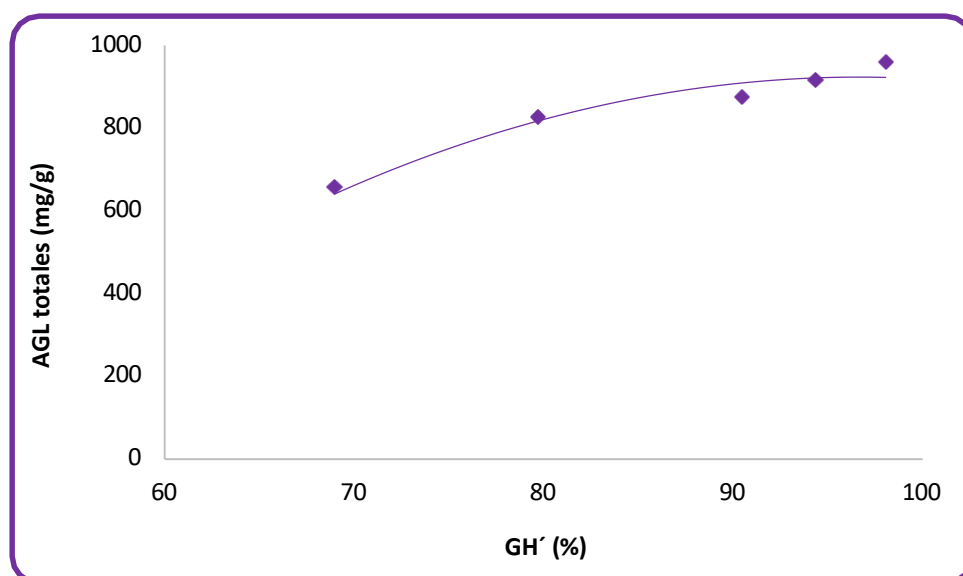


Figura 5.77.- Influencia del grado de hidrólisis (GH') alcanzado con distintas temperaturas en la cantidad total de ácidos grasos libres obtenida

5.3.6. Cinética de la hidrólisis con lipasas

El estudio cinético correspondiente a la hidrólisis con Resinase, se ha dividido en las mismas partes que el estudio cinético de la hidrólisis con Alcalasa: la determinación de la ecuación cinética con los parámetros correspondientes, la determinación de los fenómenos que justifican la forma de las curvas de hidrólisis, la determinación del mecanismo de la reacción de hidrólisis de lípidos a partir de los dos estudios anteriores y la determinación de las constantes y las energías de activación y desactivación del proceso.

5.3.6.1. Ecuación cinética que describe el proceso de hidrólisis con Resinase

Como se ha podido ver en los apartados anteriores, existe una relación obvia entre el grado de hidrólisis alcanzado con las lipasas y el porcentaje de productos recuperados por lo que se ha optado por utilizar dicho grado de hidrólisis para hacer el seguimiento cinético del proceso. Para ello se siguió la variación de GH' con el tiempo para distintas concentraciones de lipasa (tablas IIIB.1-IIIB.5 del Anexo III), de sustrato lipídico (tablas IIIC.1-IIIC.5 del Anexo III), de pH (tablas IIIE.1-IIIE.5 del Anexo III) y de temperatura (tablas IIIF.1-IIIF.5 del Anexo III).

Al igual que en la hidrólisis con proteasa, las curvas obtenidas se ajustaron por regresión no lineal comprobándose que la variación del grado de hidrólisis con el tiempo puede describirse mediante una ecuación empírica exponencial tipo Elovich en la que la variación del grado de hidrólisis con el tiempo es función de dos constantes cinéticas K_1' y K_2' .

$$\frac{dGH'}{dt} = K_1' e^{-K_2' GH'} \quad \text{Ec.5.36}$$

Para la determinación de los parámetros K_1' y K_2' , también se ha utilizado el programa informático comercial, SPSS, que realiza la regresión no lineal mediante el algoritmo de Levenberg-Marquardt. Los valores de las constantes obtenidas aparecen en las tablas 5.27 y 5.28.

Tabla 5.27.- Valores de K_1' y K_2' para las diferentes concentraciones iniciales de lipasa y de sustrato lipídico (T = 50°C, pH = 8,0)

Eo'(kLU/l)	So'(g/l)	K_1'(min-1)	K_2'
17,50	63,14	1,36±0,03	0,046±0,001
34,95	63,14	3,05±0,07	0,046±0,001
52,44	63,14	5,46±0,06	0,046±0,001
69,89	63,14	8,01±0,17	0,046±0,001
87,44	63,14	9,17±0,20	0,046±0,001
52,44	12,49	1,45±0,04	0,036±0,001
52,44	37,47	3,15±0,08	0,045±0,001
52,44	63,14	5,46±0,11	0,046±0,001
52,44	89,33	9,33±0,23	0,048±0,001
52,44	116,09	11,98±0,30	0,049±0,001

Tabla 5.28.- Valores de K_1' y K_2' para diferentes valores de pH y temperatura ($S_0' = 63,14$ g/l, $E_0' = 52,44$ kLU/l)

pH	T (°C)	K_1' (min⁻¹)	K_2'
7,0	50	7,20±0,18	0,070±0,001
7,5	50	6,49±0,10	0,059±0,001
8,0	50	5,46±0,06	0,046±0,001
8,5	50	4,55±0,11	0,038±0,001
9,0	50	2,13±0,05	0,036±0,001
8,0	40	30,78±0,70	0,065±0,001
8,0	45	16,79±0,29	0,061±0,001
8,0	50	5,46±0,06	0,046±0,001
8,0	55	3,94±0,05	0,044±0,001
8,0	60	2,51±0,04	0,042±0,001

Sustituyendo estos valores en la ecuación 5.36, se han obtenido las líneas que aparecen en las figuras 5.78-5.81 que, tal y como se puede ver, se ajustan razonablemente bien a la tendencia de los datos experimentales representados con puntos.

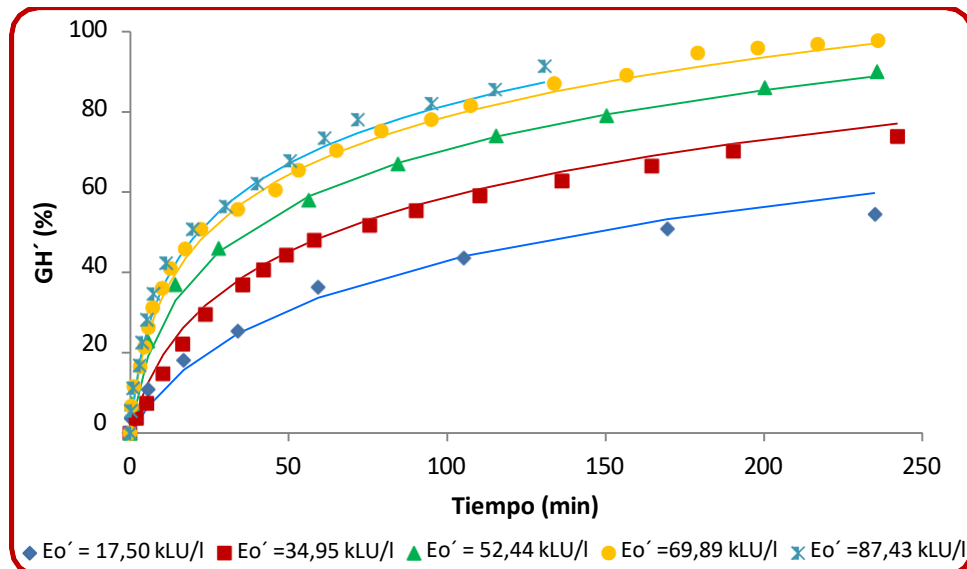


Figura 5.78.- Evolución del grado de hidrólisis (GH') con el tiempo y la concentración de lipasa (E_o') para una concentración sustrato lipídico de 63,14 g/l (T = 50°C, pH = 8,0)

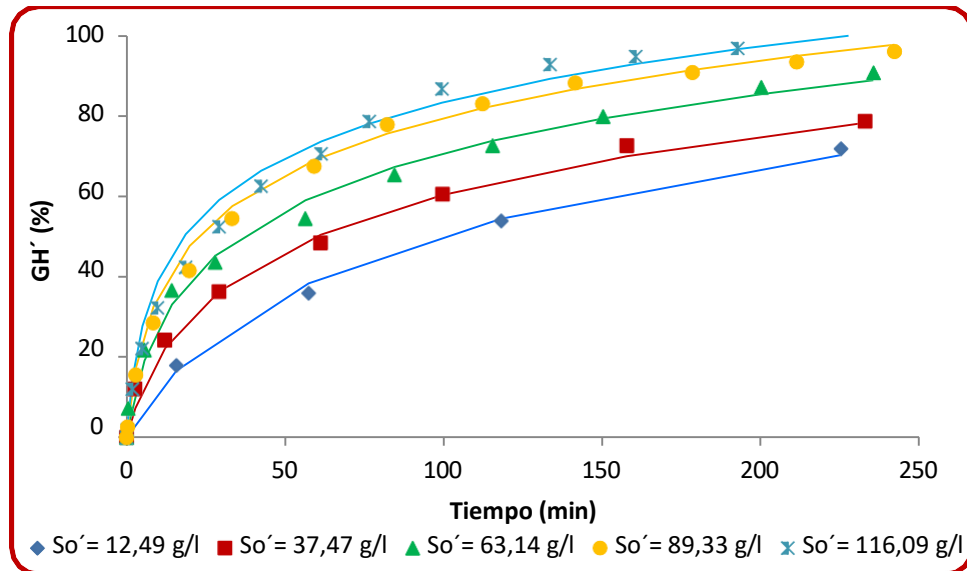


Figura 5.79.- Evolución del grado de hidrólisis (GH') con el tiempo y la concentración de sustrato lipídico (S_o') para una concentración de Resinase de 52,44 kLU/l (T = 50°C, pH = 8,0)

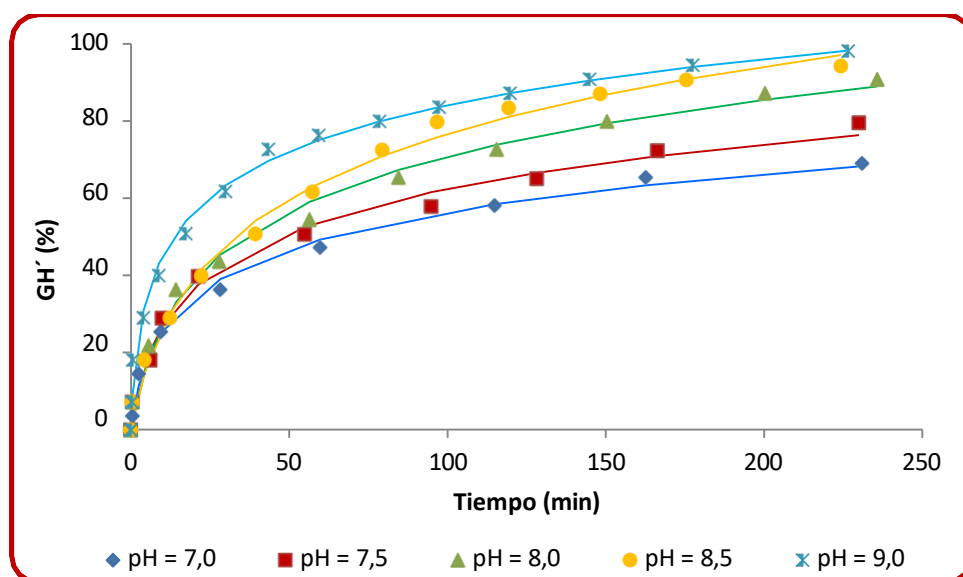


Figura 5.80.- Evolución del grado de hidrólisis (GH') con el tiempo y el pH ($So' = 63,14$ g/l, $Eo' = 52,44$ kLU/l, $T = 50^{\circ}C$)

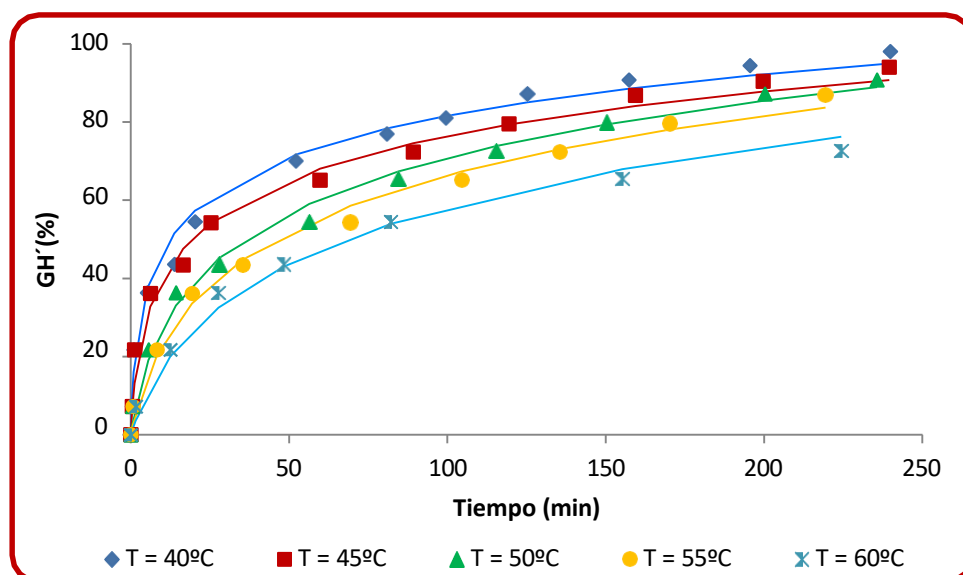


Figura 5.81.- Evolución del grado de hidrólisis (GH') con el tiempo y la temperatura T ($So' = 63,14$ g/l, $Eo' = 52,44$ kLU/l, pH = 8,0)

2. Fenómenos justificativos de las curvas de hidrólisis con Resinase

La forma de las curvas obtenidas con Resinase es análoga a la obtenida con Alcalasa: presenta, en todos los casos, una velocidad de reacción inicial muy alta seguida de una notable disminución de la misma con tendencia a un valor límite.

La justificación de esa disminución de la velocidad de hidrólisis con el tiempo se deberá pues a los mismos factores que en el caso de la hidrólisis con proteasa:

- Una disminución en la concentración de los enlaces lipídicos disponibles para la hidrólisis.
- Una desactivación de la enzima.
- Una inhibición de la enzima.

A) Disminución de enlaces lipídicos susceptibles de hidrólisis

La existencia de enlaces lipídicos susceptibles de ser hidrolizados se comprobó añadiendo un 25 % de sustrato lipídico adicional a los 60 minutos de hidrólisis, cuando ya la velocidad de hidrólisis había disminuido notablemente, (tabla AIIIG.1 del Anexo III). De este modo, en el caso de que ese fuera el factor limitante del proceso, la velocidad de reacción debería haberse incrementado marcadamente con la adición extra de sustrato, hecho que no ocurrió como puede apreciarse en la figura 5.82.

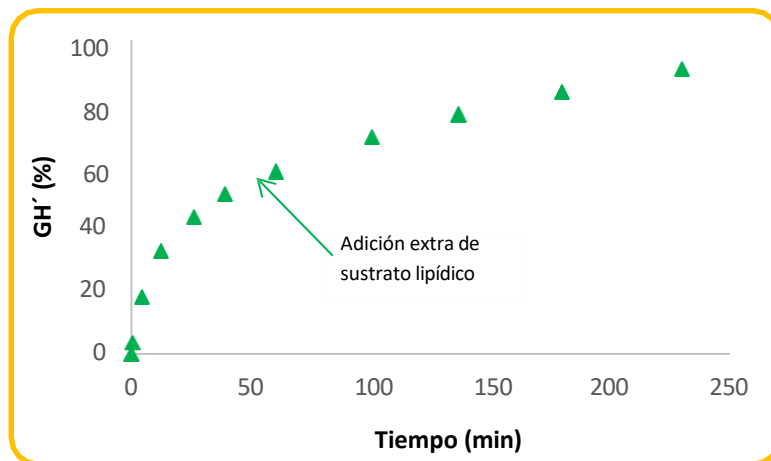


Figura 5.82.- Efecto de la adición de un 25 % extra de sustrato lipídico sobre la velocidad de reacción de hidrólisis con Resinase ($S_o' = 63,14$ g/l, $E_o' = 52,44$ kLU/l, $T = 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 8,0$)

Además, la ausencia de enlaces lipídicos susceptibles de ser hidrolizados haría que todas las curvas representativas del grado de hidrólisis frente al tiempo tendieran hacia un límite común fijado por la concentración de enlaces lipídicos susceptibles de hidrólisis en el sustrato original. Sin embargo, se puede observar en las figuras anteriores que esto ocurre, lo que también es indicativo de que el factor que origina los resultados obtenidos no es una disminución de enlaces lipídicos susceptibles de hidrólisis.

B) Desactivación enzimática

La comprobación del segundo factor, desactivación enzimática, se realizó añadiendo una cantidad de Resinase igual a la inicialmente puesta en el reactor a los 60 minutos de hidrólisis, cuando ya la velocidad de hidrólisis había disminuido sensiblemente, (tabla AIIII.1 del Anexo III). El aumento de la velocidad de reacción observado con la adición de enzima, hasta un valor análogo al obtenido al principio del proceso, es indicativo de la desactivación de la enzima (figura 5.83). La desactivación enzimática es un fenómeno bastante común ya que las enzimas son muy sensibles a cambios de pH, temperatura, fuerza iónica, esfuerzos mecánicos... (Doran, 2013).

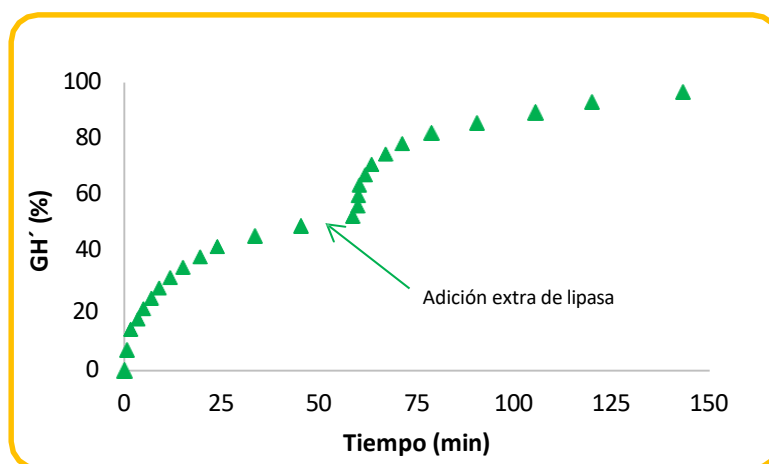


Figura 5.83.- Efecto de la adición de un 100 % extra de lipasa sobre la velocidad de reacción de hidrólisis de sustrato lipídico ($S_o' = 63,14$ g/l, $E_o' = 52,44$ kLU/l, $T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8,0$)

Para comprobar el tipo de desactivación enzimática se hizo una representación del grado de hidrólisis (GH') frente al producto de la concentración de lipasa y el tiempo (E_0t) correspondiente a los experimentos indicados en las tablas IIIB.1-IIIB.5 del Anexo III. Como se puede apreciar en la figura 5.83, se obtuvo una curva única para las distintas concentraciones de enzima ensayadas.

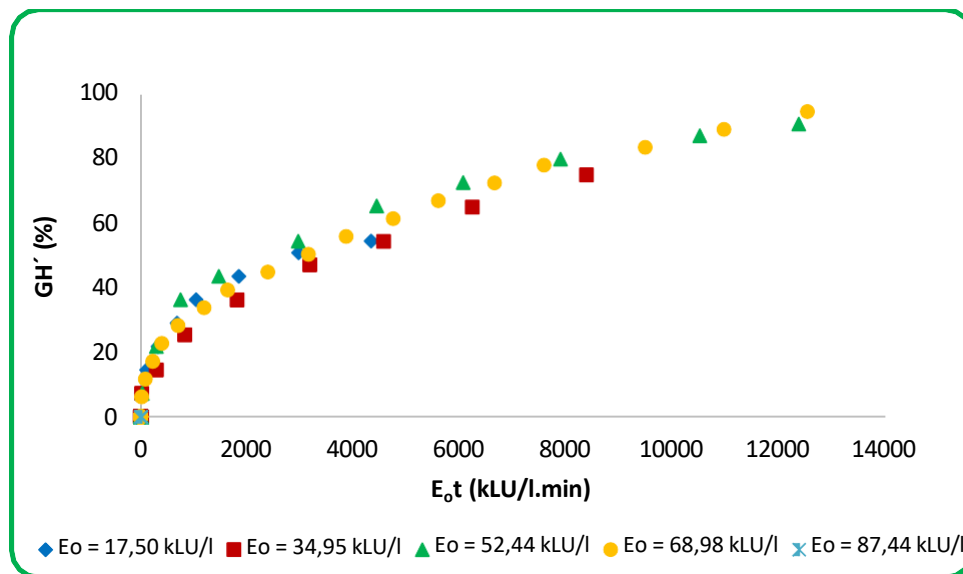


Figura 5.84.- Grado de hidrólisis (GH') frente a E_0t ($S_0' = 63,14$ g/l, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8,0$)

Como ya se comentó en el estudio con Alcalasa, la presencia de una curva única puede ser debida a dos posibilidades: la no existencia de desactivación enzimática o a desactivación enzimática de segundo orden (Figuroa et al., 2012). Puesto que, con el experimento representado en la figura 5.83, se ha acreditado la existencia de desactivación, se deduce que existe una desactivación de la lipasa de orden dos.

C) Inhibición enzimática

La existencia o no de inhibición enzimática se determinó calculando, para concentraciones iniciales de sustrato lipídico entre 12 y 116 g/l, la velocidad de hidrólisis de los lípidos (v'):

$$v' = S_o' \frac{l:x'}{l:t} \quad \text{Ec. 5.37}$$

donde $x' = GH'/100$.

Los valores calculados a partir de los datos experimentales de las tablas IIIC.1-IIIC.5 del Anexo III están incluidos en la tabla 5.29.

Tabla 5.29.- Evolución de la velocidad de reacción en la hidrólisis de lípidos con Resinase ($E_o' = 52,44$ kLU/l, $T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8,0$)

$S_o' = 12,49$ g/l		$S_o' = 37,47$ g/l		$S_o' = 63,14$ g/l		$S_o' = 89,33$ g/l		$S_o' = 116,09$ g/l	
v' (g/l.min)	GH' (%)	v' (g/l.min)	GH' (%)	v' (g/l.min)	GH' (%)	v' (g/l.min)	GH' (%)	v' (g/l.min)	GH' (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,19	8,99	1,34	6,06	2,83	7,26	7,74	2,6	8,38	2,02
0,14	17,98	1,02	12,11	1,81	21,79	3,93	15,57	7,61	12,11
0,05	35,95	0,43	24,22	1,06	36,32	1,61	28,55	3,78	22,2
0,04	53,93	0,24	36,34	0,34	43,59	0,96	41,52	2,43	32,3
0,02	71,9	0,13	48,45	0,24	54,48	0,76	54,5	1,32	42,39
		0,13	60,56	0,24	65,38	0,52	67,47	1,11	52,48
		0,10	72,67	0,15	72,64	0,32	77,85	0,88	62,57
		0,03	78,73	0,13	79,91	0,17	83,04	0,49	70,65
				0,09	87,17	0,16	88,23	0,62	78,72
					90,8	0,07	90,83	0,41	86,8
						0,06	93,42	0,21	92,85
						0,08	96,02	0,09	94,87
								0,07	96,89
								0,06	98,91

Si se representan los valores la velocidad de reacción obtenidos interpolando para determinados grados de hidrólisis (tabla 5.30) frente a la concentración inicial de sustrato lipídico se puede apreciar cómo la velocidad de reacción aumenta con S_0 pero, sin embargo, disminuye con aumento del grado de hidrólisis (figura 5.85).

Tabla 5.30.- Velocidad de reacción para grados de hidrólisis determinados y distintas concentraciones de sustrato lipídico ($E_0 = 52,44$ kLU/l, $T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8,0$)

So' (g/l)	GH' (%)		
	5	10	15
0,00	0,00	0,00	0,00
12,49	0,19	0,16	0,14
37,47	1,41	1,11	0,87
63,14	3,09	2,18	1,99
89,33	6,75	5,31	4,18
116,09	8,30	6,72	5,45

Este comportamiento es diferente al observado en la hidrólisis del sustrato proteico con Alcalasa ya que el aumento de la velocidad de hidrólisis con la concentración de sustrato lipídico indica que, en este caso, no hay inhibición por sustrato, aunque sí parece existir inhibición por producto reflejada en la reducción de la velocidad de reacción con el incremento del grado de hidrólisis (figura 5.85). La existencia de inhibición por productos en la hidrólisis de aceites y grasas con lipasas es un fenómeno ya reflejado por otros autores (Malcata et al., 1992; Al-Zuhair, 2006), incluso algunos investigadores han indicado que son los propios ácidos grasos liberados en el proceso los causantes de la inhibición (Tsai y Chiang, 1991).

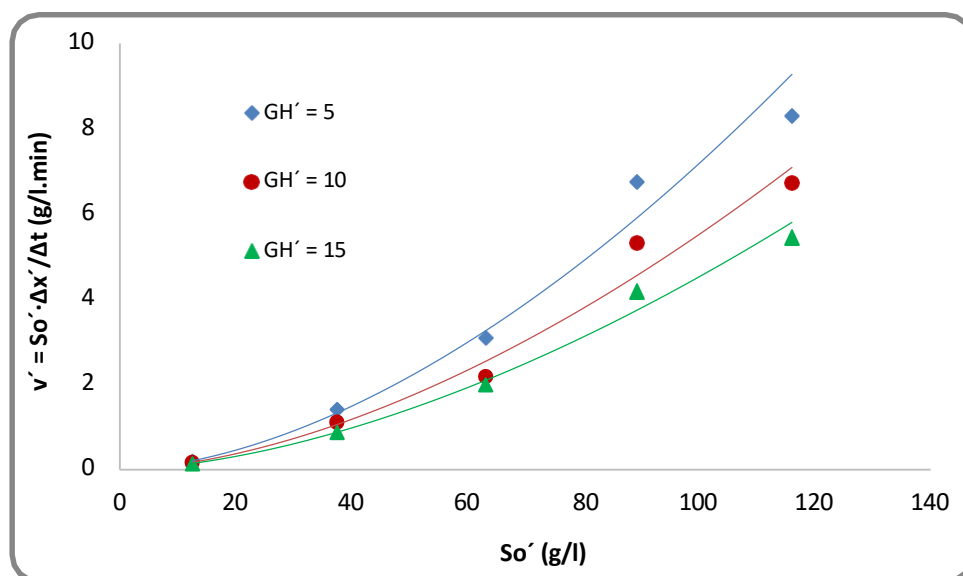


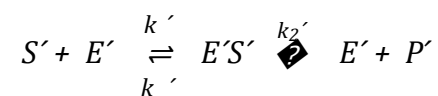
Figura 5.85.- Velocidad de reacción para diferentes concentraciones iniciales de sustrato lipídico y diferentes grados de hidrólisis

Una vez comprobada la existencia de inhibición por producto, así como desactivación de la enzima, se plantea en el siguiente apartado un mecanismo incluyendo estos fenómenos para justificar la ecuación 5.36 definitoria de la cinética de esta hidrólisis.

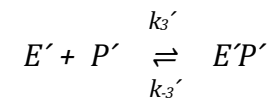
5.3.6.3. Mecanismo de la reacción de hidrólisis con Resinase

En esta ocasión, la cinética del proceso puede describirse por medio de tres reacciones:

- *Reacción de hidrólisis:* Etapa de formación del complejo lipasa-sustrato lipídico que se descompone, posteriormente, para liberar el producto:



- *Reacción de inhibición de la enzima por los productos:* La hidrólisis se ve inhibida por sus productos, ya que algunos mono o diglicéridos o ácidos grasos, formados en la hidrólisis, pueden competir con el sustrato lipídico:



- *Reacción de desactivación enzimática:* el hecho de que se haya comprobado experimentalmente que la desactivación de la enzima disminuye en presencia de sustrato siguiendo una cinética de orden dos parece indicar que, al igual que en la hidrólisis del sustrato proteico con Alcalasa, en el mecanismo de desactivación interviene el sustrato de modo que el proceso puede venir dado por la reacción entre la enzima libre y el complejo enzima-sustrato:



donde E' es la lipasa total, S' la fracción lipídica del sustrato, $E'S'$ el complejo lipasa-sustrato lipídico, P' el producto, $E'P'$ el complejo lipasa-producto, E_a' es la lipasa activa, E_i' es la lipasa desactivada y k_1' , k_{-1}' , k_2' , k_3' , k_{-3}' y k_d' las constantes cinéticas de reacción.

La velocidad de hidrólisis estará determinada por la etapa irreversible de formación de producto:

$$v' = \frac{d[P']}{dt} = k_2' [E'S'] \quad \text{Ec. 5.38}$$

El seguimiento de la hidrólisis de lípidos se ha llevado a cabo mediante el método del pH-estado, determinando el grado de hidrólisis alcanzado con el tiempo, por lo que la concentración de producto se puede expresar en función de la concentración inicial de sustrato lipídico y del grado de hidrólisis expresado en tanto por uno:

$$v' = \frac{d[P']}{dt} = S_0' \frac{dx'}{dt} = k_2' [E'S'] \quad \text{Ec. 5.39}$$

donde S_0' es la concentración inicial de sustrato lipídico, t el tiempo, $[P']$ la concentración de producto, $[E'S']$ la concentración de complejo lipasa-sustrato lipídico y $x' = GH'/100$.

La velocidad de desactivación de la enzima vendrá dada por:

$$\frac{d[E']}{dt} = -k_d' [E'] [E'S'] \quad \text{Ec. 5.40}$$

donde $[E']$ es la concentración de lipasa.

Combinando ambas ecuaciones se obtiene la relación entre la velocidad de hidrólisis y la de desactivación:

$$-S_0' \frac{dx'}{dE'} = \frac{k_2'}{k_d'} \frac{1}{[E']} \quad \text{Ec. 5.41}$$

De acuerdo con la reacción de hidrólisis, cuando la reacción se lleva a cabo en un reactor de mezcla completa bien agitado como es el caso, el balance de materia al complejo $E'S'$ será el siguiente:

$$\frac{d[E'S']}{dt} = k_1 [E][S] - (k_{-1}' + k_2') [E'S'] \quad \text{Ec. 5.42}$$

Como se comentó en el estudio de la cinética de la hidrólisis con proteasas, aunque la variación de la concentración de complejo en el instante de mezcla debe ser positiva debido a que en ese instante no existe nada de complejo enzima-sustrato, la velocidad de eliminación de dicho complejo se incrementa rápidamente de forma que, después de muy poco tiempo, se compensa con la velocidad de producción, alcanzándose el estado estacionario para dicho complejo (Dixon, 1979). Además, en los experimentos realizados, las concentraciones de sustrato y producto son mucho mayores que las de enzima lo que las variaciones que pueda haber en el complejo enzima-sustrato son insignificantes frente a las variaciones de reactivos y productos.

De acuerdo con eso, $d[E'S']/dt = 0$ por lo que:

$$[E'S'] = \frac{k_1'}{k_{-1}' + k_2' K_M} [E][S'] = \frac{[E][S']}{K_M} \quad \text{Ec. 5.43}$$

donde K_M' es la constante de Michaelis-Menten para la hidrólisis de lípidos.

De igual modo, el balance de materia correspondiente al complejo enzima-producto en el estado estacionario será:

$$\frac{d[E'P']}{dt} = k_3' [E][P'] - k_{-3}' [E'P'] = 0 \quad \text{Ec. 5.44}$$

$$[E'P'] = \frac{k_3'}{k_{-3}'} [E][P'] = \frac{[E][P']}{K_P'} \quad \text{Ec. 5.45}$$

siendo $[P']$ la concentración de producto, $[E'P']$ la concentración de complejo lipasa-producto y K_P' la constante global de inhibición por producto.

La enzima presente E' estará libre $[E']$, complejada con el sustrato $[E'S']$ o complejada con el producto $[E'P']$, por lo que combinando las ecuaciones 5.43 y 5.45, se obtiene que:

$$E' = [E'] + [E'S'] + [E'P'] = [E'] \left(1 + \frac{[S']}{K_{M'}} + \frac{[P']}{K_P} \right) \quad \text{Ec. 5.46}$$

Despejando en esa ecuación la concentración de enzima libre se llega a la siguiente expresión:

$$[E'] = \frac{E'}{1 + \frac{[S']}{K_{M'}} + \frac{[P']}{K_P}} \quad \text{Ec. 5.47}$$

Si el proceso de inhibición por producto no es controlante, sino que predomina la afinidad de la enzima por el sustrato

$$1 + \frac{[S']}{K} \gg \frac{[P']}{K_P}$$

y como $[S'] \approx S_0'$ dado que la concentración de complejo formado es muchísimo menor que la concentración inicial de sustrato ($[E'S'] \lll S_0'$) porque la concentración inicial de lipasa es mucho menor que la concentración inicial de sustrato lipídico utilizada en los ensayos ($E_0' \lll S_0'$)

$$[E'] = \frac{E'}{1 + \frac{S_0'}{K_{M'}}} = \frac{K_{M'} E'}{K_{M'} + S_0'} \quad \text{Ec. 5.48}$$

Sustituyendo esta expresión de $[E']$ en la ecuación 5.41 se obtiene la ecuación

5.49:

$$-S_o' \frac{dx'}{dE'} = \frac{k_2'(K_M' + S_o')}{k_d'K_M'} \frac{l}{E'} \quad \text{Ec. 5.49}$$

Se puede obtener una expresión para la evolución de la concentración de lipasa en función del grado de hidrólisis a partir de la separación de variables y la integración de la ecuación 5.49 entre los límites de las condiciones iniciales y finales de la reacción:

$$E' = E_o' e^{-\frac{k_d'K_M'S_o'}{k_2'(K_M' + S_o')} x'} \quad \text{Ec. 5.50}$$

Combinando las ecuaciones 5.39, 5.43 y 5.47 y 5.50, y considerando, como se ha indicado, que $[S'] \approx S_o'$, la ecuación de velocidad vendrá dada por:

$$v' = S_o' \frac{dx'}{dt} = \frac{k_2'}{(K_M' + S_o')} S_o' E_o' e^{-\frac{k_d'K_M'S_o'}{k_2'(K_M' + S_o')} x'} \quad \text{Ec. 5.51}$$

o bien

$$\frac{dx'}{dt} = \frac{k_2'E_o'}{(K_M' + S_o')} e^{-\frac{k_d'K_M'S_o'}{k_2'(K_M' + S_o')} x'} \quad \text{Ec. 5.52}$$

Sustituyendo x' por $GH'/100$ se obtiene la expresión empírica dada por la ecuación 5.36, en la que:

$$K_1' = \frac{k_2' E_0'}{(K_M' + S_0')} \quad 100 \quad \text{Ec. 5.53}$$

$$K_2' = \frac{k_d' K_M' S_0'}{k_2' (K_M' + S_0')} \frac{1}{100} \quad \text{Ec. 5.54}$$

Dado que los lípidos no son solubles en el medio acuoso en el que se lleva a cabo la hidrólisis, algunos autores han desarrollado complejos mecanismos que incluyen adsorción de la enzima en el sustrato antes de la formación del complejo lipasa-lípido para justificar la cinética del proceso (Rusli et al., 2020; Al-Zuhair et al., 2003). En esos modelos es preciso conocer el tamaño de gota de lípido lo que hace que solo sean aplicables en estudios con materias primas puras, no en casos como el de residuos de carnicería donde no es posible determinar esos datos al ser la materia prima una mezcla de numerosos componentes.

Sin embargo, cuando el agua está presente en gran cantidad en el medio de reacción, que es lo habitual y así ocurre en nuestro caso, esos complejos modelos pueden ser simplificados a ecuaciones mucho más sencillas que se asemejan a la ecuación de Michaelis-Menten (Paiva et al., 2000). Por ello, con el mecanismo propuesto en este trabajo se obtiene un ajuste del modelo suficientemente representativo.

Hay que destacar que, si bien los resultados obtenidos tanto en la hidrólisis de proteínas con proteasas como en la hidrólisis de lípidos con lipasas se ajustan a un mismo tipo de ecuación cinética (una ecuación empírica exponencial tipo Elovich), los mecanismos que justifican esa ecuación son diferentes como se ha podido observar.

5.3.6.4. Constantes y energías de activación y desactivación del proceso con Resinase

De acuerdo con las expresiones obtenidas para K_1' y K_2' en las ecuaciones 5.53 y 5.54, respectivamente, el parámetro K_1' depende de la concentración inicial tanto de lipasa como de sustrato lipídico mientras que el parámetro K_2' depende de la concentración de sustrato lipídico, pero no de la concentración inicial de lipasa. El ajuste de los resultados experimentales confirma esta hipótesis ya que, si se no se modifican los valores de S_o' , K_2' se mantiene constante aunque varíen los valores de E_o' (tabla 5.27). Sin embargo, en el caso de K_1' se puede apreciar variación de ese parámetro tanto con S_o' como con E_o' (tabla 5.27).

Para determinar el valor de la constante de Michaelis Menten en el proceso, se ha linealizado la ecuación 5.54 obteniendo la expresión siguiente:

$$\frac{1}{K_2'} = \frac{100 k_2'}{K_M' k_d'} + \frac{100 k_2'}{k_d'} \frac{1}{S_o'} \quad \text{Ec. 5.55}$$

En la figura 5.86 aparece representada la inversa de K_2' frente a la inversa de la concentración inicial de sustrato lipídico S_o' .

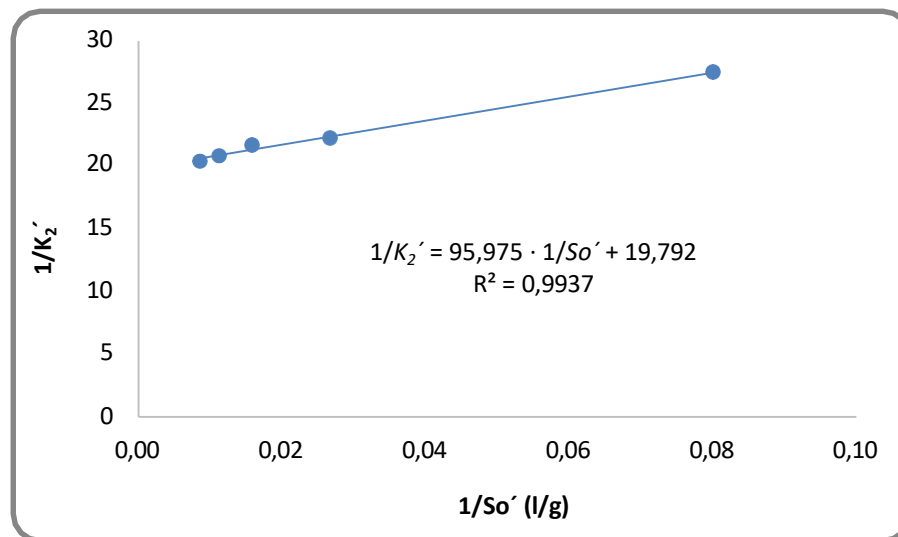


Figura 5.86.- Relación entre el parámetro K_2' y la concentración inicial de sustrato lipídico S_o'

El cociente entre la pendiente y la ordenada en el origen de la recta obtenida a partir de la ecuación 5.55 permite determinar el valor de la constante de Michaelis-Menten K_M' :

$$K_M' = 4,85 \text{ g/l}$$

La representación de K_I' frente a la concentración inicial de Resinase E_o' se incluye en la figura 5.87. Para poder comparar los resultados de k_2' con los dados por otros autores, la concentración inicial de enzima se ha puesto en g/l en lugar de en kLU/l. En la tabla 5.31 se incluye la equivalencia entre los μl de lipasa añadidos al reactor, las kLU/l (que es la unidad que se ha utilizado hasta ahora para expresar la concentración inicial de lipasa por ser mejor indicador de la actividad enzimática) y los g/l, teniendo en cuenta que la actividad de la Resinase es de 50 kLU/g, su densidad es de 1.05 g/ml y que el volumen total de mezcla en el reactor es de 0.3 l.

Tabla 5.31.- Lipasa inicial añadida al reactor (E_o') expresada en diferentes unidades

μl	g/l	kLU/l
100	0,35	17,50
200	0,70	34,95
300	1,05	52,44
400	1,40	69,89
500	1,75	87,44

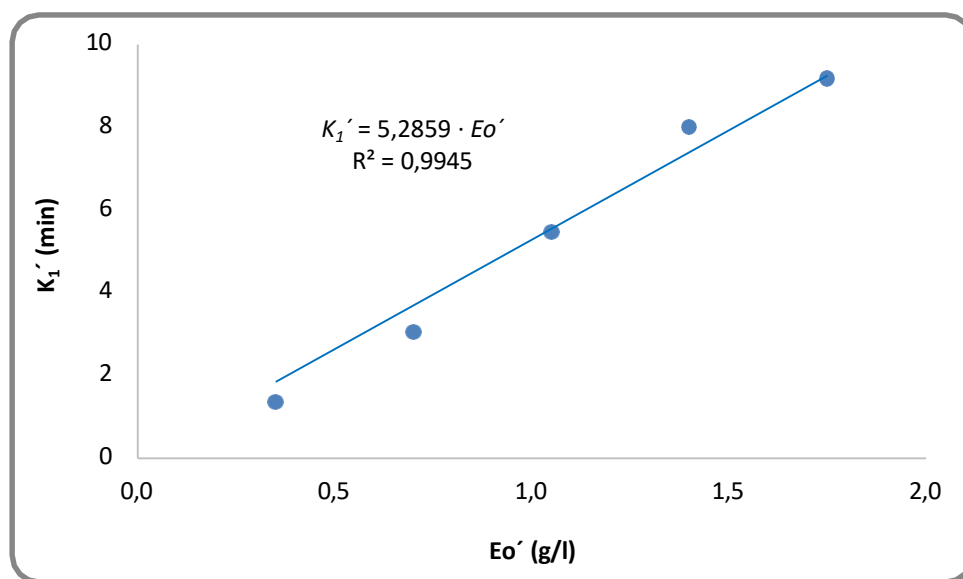


Figura 5.87.- Relación entre el parámetro K_1' y la concentración inicial de lipasa E_o' ($S_o' = 63,14$ g/l)

Puesto que, según la ecuación 5.53, la pendiente de esta recta es igual a $100 \cdot k_2' / (K_M' + S_o')$, para una concentración inicial de sustrato lipídico de 63.14 g/l y conocido el valor de K_M' determinado anteriormente, se puede calcular el valor de k_2' :

$$k_2' = 3,59 \text{ min}^{-1}$$

Valores del mismo orden para K_M' y k_2' han sido obtenidos por Peinado et al. (2018) en un estudio de hidrólisis de la grasa de la leche con lipasas pancreáticas.

Conocidos los valores de K_M' y k_2' y sabiendo que, de acuerdo con la ecuación 5.55, la ordenada en el origen de la recta de la figura 5.86 es igual a $100 \cdot k_2' / (K_M' \cdot k_d')$, se puede establecer el valor de la constante de desactivación de la Resinase:

$$k_d = 3,74 \text{ l/g} \cdot \text{min}^{-1}$$

No hay datos en la bibliografía sobre la desactivación de la Resinase, por lo que no ha podido compararse el resultado obtenido con estudios previos.

La concordancia de los valores de las constantes cinéticas con los obtenidos en otros trabajos, así como los elevados coeficientes de regresión ($R^2 > 0,99$) del ajuste de las rectas obtenidas al representar K_1' y K_2' frente a So' y EO' , confirman el mecanismo propuesto.

Los valores de las energías de activación y desactivación enzimática se pueden determinar realizando un estudio de la influencia de la temperatura sobre las constantes cinéticas k_2' y k_d' manteniendo el resto de las variables constantes ($So' = 63,14$ g/l, $EO' = 52,44$ UA/l y pH= 8). Dada la relación existente entre esas constantes y los parámetros K_1' y K_2' , puede establecerse directamente una relación entre K_1' y K_2' con la temperatura T a través de la ecuación de Arrhenius. Como puede apreciarse en la tabla 5.28, tanto K_1' como K_2' son, efectivamente, dependientes de la temperatura.

$$K_1' = A_a' e^{-\frac{LE_a'}{RT}} \quad \text{Ec. 5.56}$$

$$K_1' \quad K_2' = A_d' e^{-\frac{LE_d'}{RT}} \quad \text{Ec. 5.57}$$

Las ecuaciones anteriores pueden linealizarse de la siguiente manera:

$$\ln K_1' = \ln A_a' - \frac{LE_a'}{R} \frac{1}{T} \quad \text{Ec. 5.58}$$

$$\ln (K_1' \quad K_2') = \ln A_d' - \frac{LE_d'}{R} \frac{1}{T} \quad \text{Ec. 5.59}$$

donde A_a' y A_d' son los factores de frecuencia, $\Delta E_a'$ y $\Delta E_d'$ son las energías de activación de la hidrólisis y de desactivación de la lipasa, respectivamente, y R es la constante de los gases (8,314 J/mol·K).

A partir de la representación gráfica de esas linealizaciones (figuras 5.88 y 5.89) se obtienen el valor de la energía de activación de la hidrólisis enzimática de la fracción lipídica del residuo cárnico con Resinase y el valor de la energía de desactivación de la lipasa.

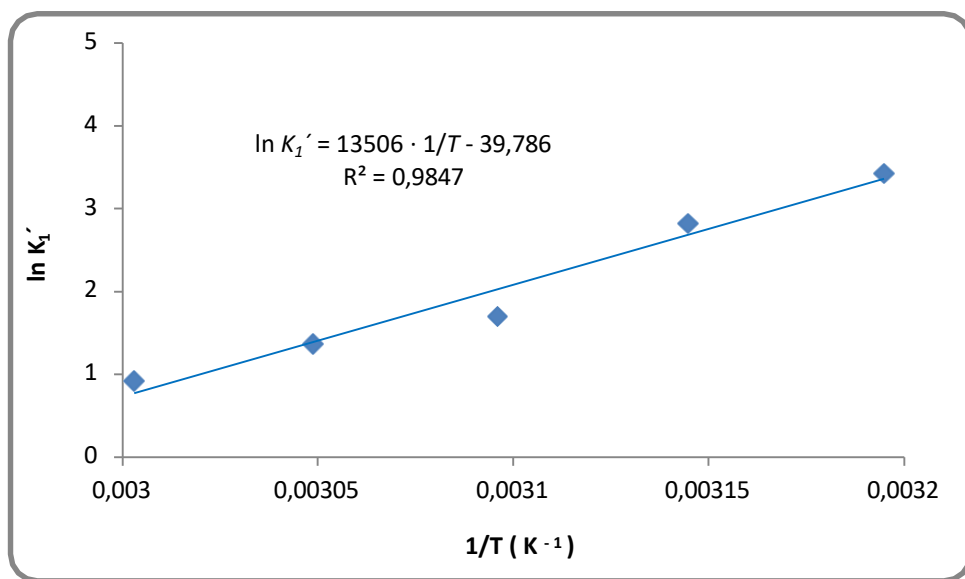


Figura 5.88.- Variación de la constante cinética K_1' con la temperatura T

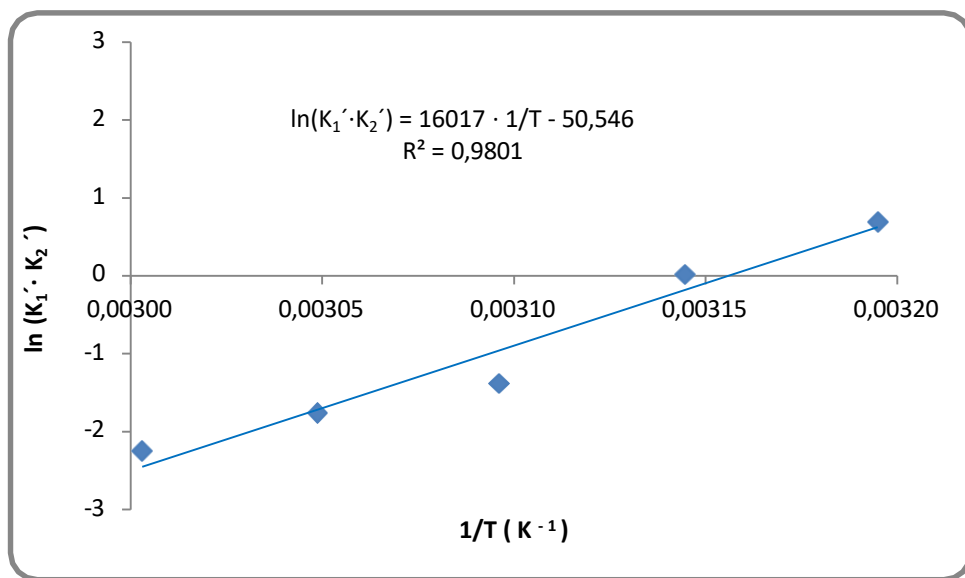


Figura 5.89.- Variación del producto de las constantes cinéticas K_1' y K_2' con la temperatura T

Nuevamente se han obtenido energías negativas, que parecen contradecir la ley de Arrhenius, igual que en los estudios de hidrólisis realizados con Alcalase:

$$\Delta E_a' = - 122,89 \text{ kJ/mol}$$

$$\Delta E_d' = - 133,16 \text{ kJ/mol}$$

Tampoco en este caso es posible comparar los valores obtenidos para $\Delta E_a'$ y $\Delta E_d'$ con los obtenidos en otros trabajos bibliográficos al no existir estudios de hidrólisis de la fracción lipídica de residuos de carnicería o similares en los que se hayan determinado estos parámetros. Ni siquiera se pueden comparar los valores aquí obtenidos con los obtenidos en la hidrólisis de otro tipo cualquiera de lípido utilizando Resinase como lipasa ya que no hay estudios bibliográficos al respecto.

Sin embargo, la obtención de estos valores negativos parece confirmar la hipótesis que se hizo en el estudio con Alcalase: es posible obtener energías negativas porque el proceso transcurre en varias etapas, unas reversibles y otras irreversibles, se forman complejos intermedios y hay desnaturalización de la enzima, todas ellas circunstancias que pueden originar que los coeficientes cinéticos disminuyan al aumentar la temperatura alcanzándose energías de activación o desactivación negativas (Bertrán y Núñez, 2007; Fabiano y Pergo, 2002; Mozurkewich y Benson, 1984; Muench et al., 1996). Por otra parte, Zhang et al. (2011) también obtuvieron energías de activación negativas al utilizar hidrolasas lo que parece confirmar los resultados obtenidos en esta tesis.

4. Hidrólisis con proteasas y lipasas simultáneamente

Con la finalidad de optimizar el proceso obteniendo en una única etapa hidrolizados enzimáticos, colágeno y ácidos grasos, se procedió a realizar experimentos de hidrólisis utilizando como catalizador enzimático una mezcla de Alcalase y Resinase que son las enzimas que han demostrado ser más eficaces en el proceso.

Para reducir al mínimo el número de experimentos a llevar a cabo se realizó un diseño de experimentos utilizando el método Taguchi.

Dado que, en la hidrólisis con una mezcla de proteasa y lipasa (tablas IV.1-IV.13 del Anexo IV), no es posible el seguimiento del grado de hidrólisis mediante el método del pH-metro utilizado ya que el consumo de NaOH se emplea en neutralizar la subida de pH debida tanto a la formación de grupos carboxílicos por la hidrólisis de proteínas como a la formación de ácidos grasos por la hidrólisis de lípidos, las variables a optimizar seleccionadas han sido:

- El porcentaje de proteína solubilizada (que indica la cantidad de hidrolizado proteico producido).
- El porcentaje de colágeno no hidrolizado (que indica la cantidad de colágeno que se puede recuperar)
- El porcentaje de lípidos separados (que indica la cantidad de ácidos grasos producidos)
- El porcentaje de residuo no solubilizado (que indica la cantidad de residuo que deberá llevarse a vertedero a pesar del tratamiento).

El tipo de optimización que se ha buscado ha sido “mayor-mejor”, para los porcentajes de solubilización de proteína, de colágeno no hidrolizado y de lípidos separados, y “menor-mejor” para el porcentaje de residuo no solubilizado.

A la vista de los resultados obtenidos en los estudios previos con las enzimas por separado (apartados 5.2 y 5.3 de este capítulo), los factores de control seleccionados fueron los que mostraron ser determinantes en el proceso:

- Relación concentración inicial de proteasa/concentración inicial de sustrato proteico (Eo/So).

- Relación concentración inicial de lipasa/concentración inicial de sustrato lipídico (Eo'/So').
- pH.
- Temperatura.

No se ha considerado la influencia del tiempo de hidrólisis ya que, según resultados de estudios anteriores es imprescindible un tiempo mínimo de tres horas para llegar a los valores máximos de transformación del sustrato que apenas varían en el transcurso de la hora siguiente. Por ello, el tiempo de hidrólisis se ha mantenido en 240 minutos.

Cada uno de los factores seleccionados fueron modificados dentro de unos ciertos límites (niveles). Todos los factores fueron estudiados a 3 niveles. Los niveles se seleccionaron en el intervalo en el que se conseguía la relación más adecuada entre la cantidad de hidrolizado proteico producida, la cantidad de colágeno sin hidrolizar, la cantidad de ácidos grasos producida y la cantidad de residuo sin solubilizar. Los valores seleccionados fueron los siguientes:

- **Relación Eo/So:** La influencia de la concentración de proteasa y de la concentración de sustrato proteico se analizó mediante la relación Eo/So. Los niveles de esta relación estuvieron entre 0,11 y 0,21 UA/g, valores que, de acuerdo con los estudios previos, permitían obtener hidrolizados proteicos con un peso molecular adecuado para su uso en la industria alimentaria.
 - Nivel 1: $Eo/So = 0,11$
 - Nivel 2: $Eo/So = 0,16$
 - Nivel 3: $Eo/So = 0,21$
- **Relación Eo'/So':** La influencia de la concentración de lipasa y de la concentración de sustrato lipídico se analizó mediante la relación Eo'/So'. Los niveles de esta relación se fijaron entre 0,55 y 1,11 kLU/g; según los estudios previos, en ese intervalo se obtenían cantidades elevadas de ácidos grasos libres sin encarecimiento innecesario del proceso.
 - Nivel 1: $Eo'/So' = 0,55$
 - Nivel 2: $Eo'/So' = 0,83$
 - Nivel 3: $Eo'/So' = 1,11$

- **pH:** Los tres niveles considerados se encontraron entre 7,5 y 8,5, valores para los que se obtenían cantidades elevadas de hidrolizado proteico, colágeno y ácidos grasos sin un coste excesivo de acuerdo con los estudios previos.
 - Nivel 1: pH = 7,5
 - Nivel 2: pH = 8,0
 - Nivel 3: pH = 8,5

- **Temperatura:** Los tres niveles estudiados tuvieron como límite inferior 45 °C y como límite superior 55°C. Al igual que en el caso del pH, se eligió este intervalo porque era en el que alcanzaban cantidades elevadas de hidrolizado proteico, colágeno y ácidos grasos sin un coste excesivo tal y como se comprobó en los estudios previos
 - Nivel 1: T = 45°C
 - Nivel 2: T = 50°C
 - Nivel 3: T = 55°C

De acuerdo con esto, el diseño de experimentos (DOE) considerados para este estudio se presenta en la tabla 5.32.

Tabla 5.32.- DOE del estudio de hidrólisis con Alcalase y Resinase simultáneamente

Factores	Niveles		
	1	2	3
Eo/So (UA/g)	0,11	0,16	0,21
Eo'/So' (kLU/g)	0,55	0,83	1,11
pH	7,5	8,0	8,5
T (°C)	45	50	55

Mediante la metodología Taguchi se utilizó un arreglo ortogonal L9, que permite estudiar 4 factores a 3 niveles mediante 9 experimentos (tabla 5.33).

Tabla 5.33.- DOE L9 ortogonal

Nº experimento	Eo/So (UA/g)	Eo´/So´ (kLU/g)	pH	Temperatura (°C)
1	0.11	0,55	7.5	45
2	0.11	0,83	8.0	50
3	0.11	1,11	8.5	55
4	0.16	0,55	8.0	55
5	0.16	0,83	8.5	45
6	0.16	1,11	7.5	50
7	0.21	0,55	8.5	50
8	0.21	0,83	7.5	55
9	0.21	1,11	8.0	45

En este estudio, todos los diseños y análisis se han realizado utilizando el software estadístico Minitab 19.

Con la finalidad de comprobar si la realización de la hidrólisis con mezclas de Alcalase y Resinase y los efectos combinados de las variables del proceso podían haber modificado la tendencia de las variables estudiadas respecto a lo observado con las enzimas individualmente, se analizan a continuación los resultados obtenidos (tablas IV.10-IV.13 del Anexo IV).

1. Análisis individual de los factores de control estudiados

El estudio de los resultados obtenidos se ha iniciado realizando el análisis individual de los factores de control.

1. Influencia de la relación concentración inicial de proteasa / concentración inicial de sustrato proteico (Eo/So)

Para estudiar el efecto de la concentración inicial de proteasa y la concentración inicial de sustrato proteico, se trabajó con tres valores de la relación Eo/So: 0,11, 0,16 y 0,21 UA/g.

En la figura 5.90 se muestra la influencia de la relación Eo/So en el porcentaje de lípidos separados. Los resultados indican que ese porcentaje se incrementa al aumentar el valor de Eo/So de 0,11 a 0,16 UA/g valor a partir del cual el porcentaje de lípidos varía en menor grado.

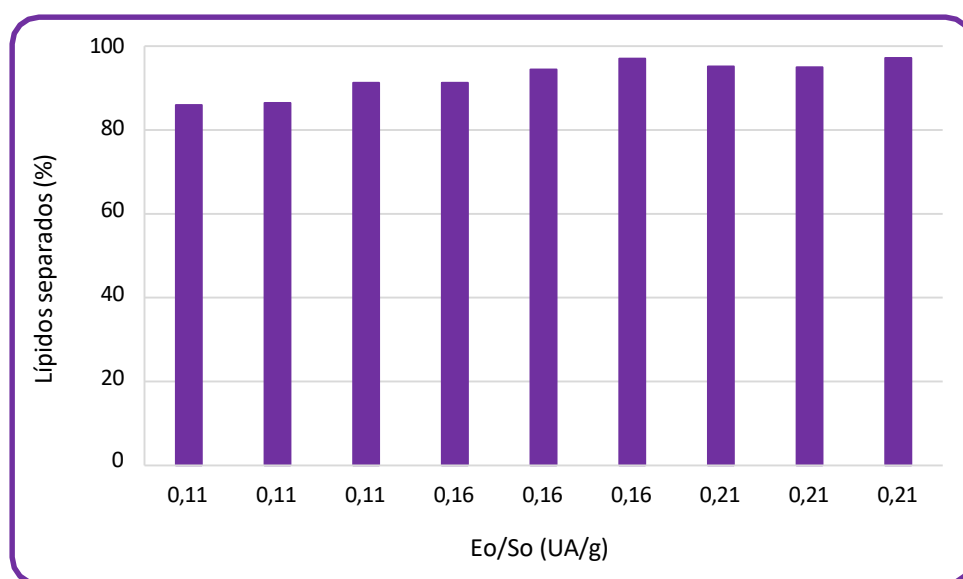


Figura 5.90.- Influencia de la relación Eo/So en el porcentaje de lípidos recuperados

En el caso del porcentaje de proteína solubilizada, indicativa de la cantidad de hidrolizado proteico producido, se aprecia que un aumento del valor de Eo/So de 0,11 a 0,21 UA/g genera un incremento lineal en el porcentaje de proteína solubilizada (figura 5.91).

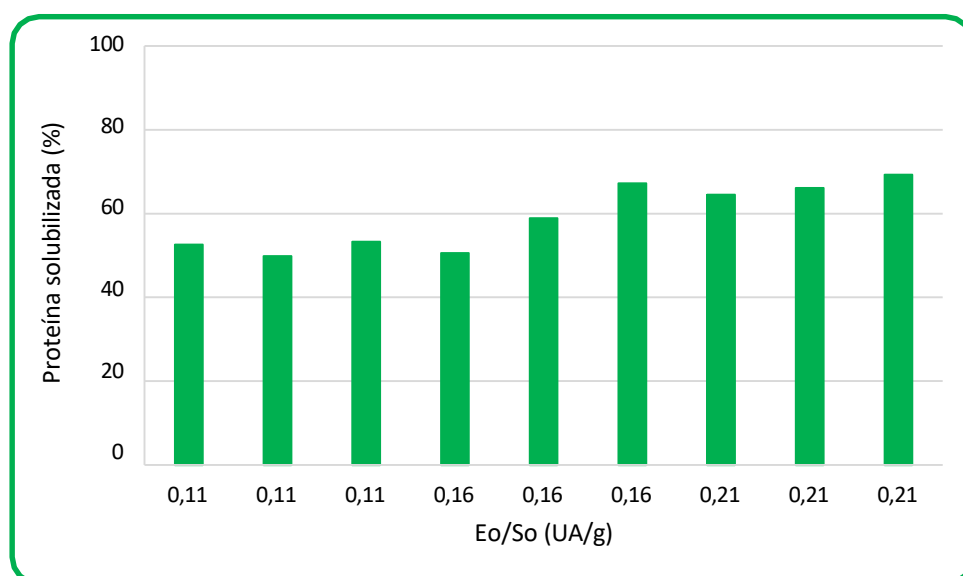


Figura 5.91.- Influencia de la relación Eo/So en el porcentaje de proteína solubilizada

Para el porcentaje de colágeno no hidrolizado, se observa el efecto opuesto: se aprecia un claro aumento del porcentaje de colágeno al disminuir Eo/So de 0,21 a 0,11 UA/g (figura 5.92).

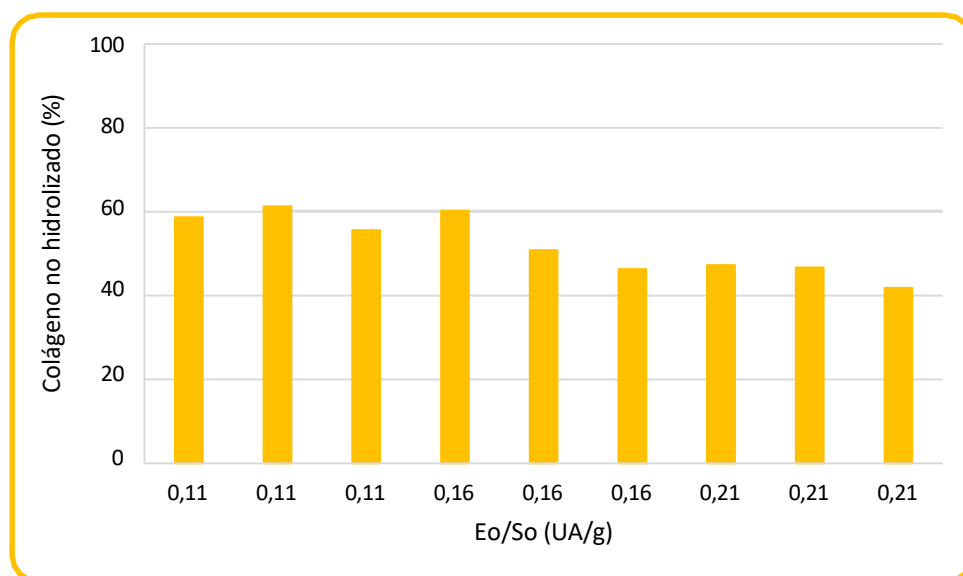


Figura 5.92.- Influencia de la relación Eo/So en el porcentaje de colágeno no hidrolizado

El porcentaje de residuo no solubilizado obtenido es inferior al 10 % para todos los valores de Eo/So analizados, siendo los valores más altos para 0,11 UA/g y disminuyendo en el intervalo de 0,16 a 0,21 UA/g (figura 5.93).

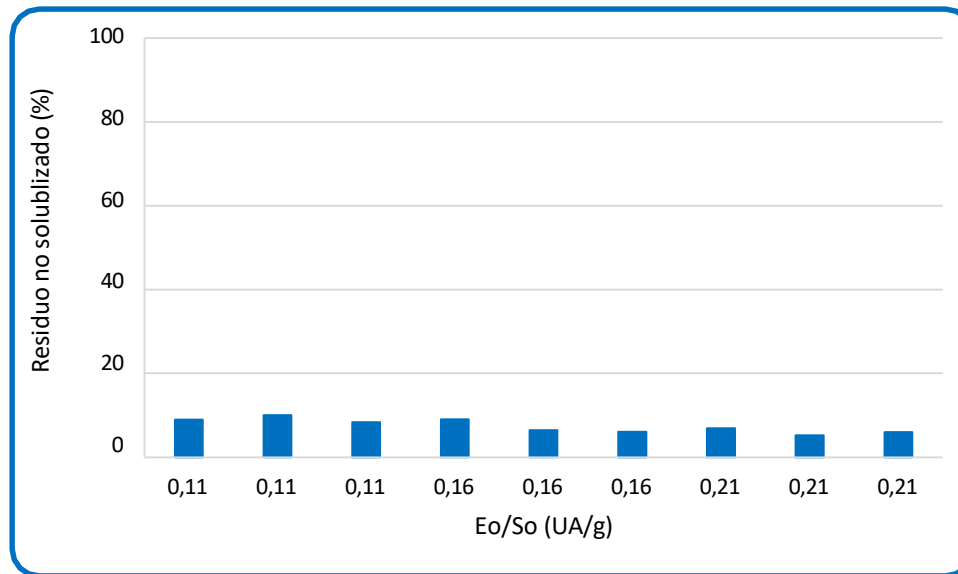


Figura 5.93.- Influencia de la relación Eo/So en el porcentaje de residuo no solubilizado

5.4.1.2. Influencia de la relación concentración inicial de lipasa / concentración inicial de sustrato lipídico (Eo'/So')

El estudio del efecto de la concentración inicial de lipasa y la concentración inicial de sustrato lipídico se llevó a cabo analizando diferentes valores para Eo'/So': 0,55, 0,83 y 1,11 kLU/g.

En la figura 5.94 se puede apreciar como el porcentaje de lípidos recuperados aumenta en el intervalo de 0,55 a 1,11 kLU/g.

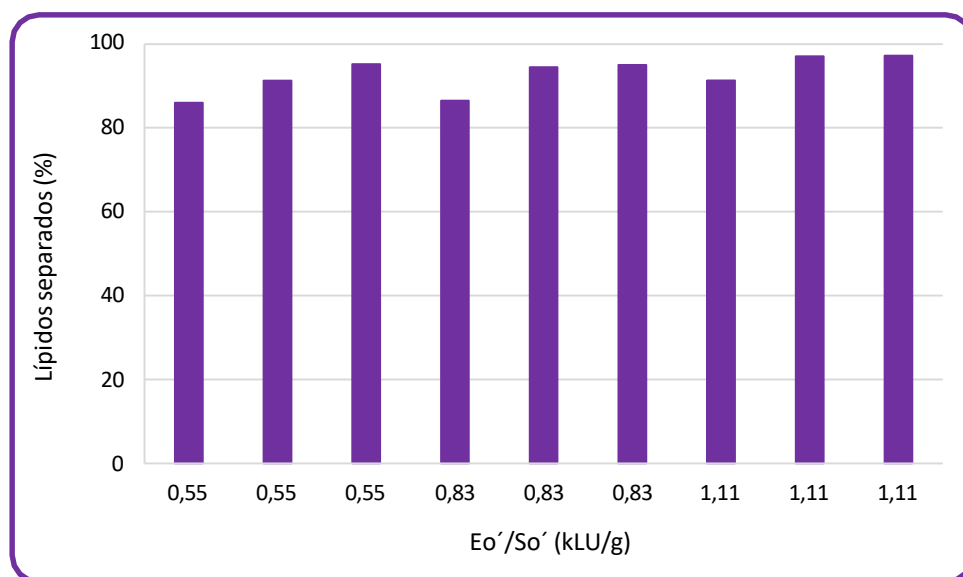


Figura 5.94.- Influencia de la relación Eo'/So' en el porcentaje de lípidos recuperados

En general, también se aprecia un incremento en el porcentaje de proteína solubilizada al aumentar la relación Eo'/So' de 0,55 a 1,11 kLU/g (figura 5.95).

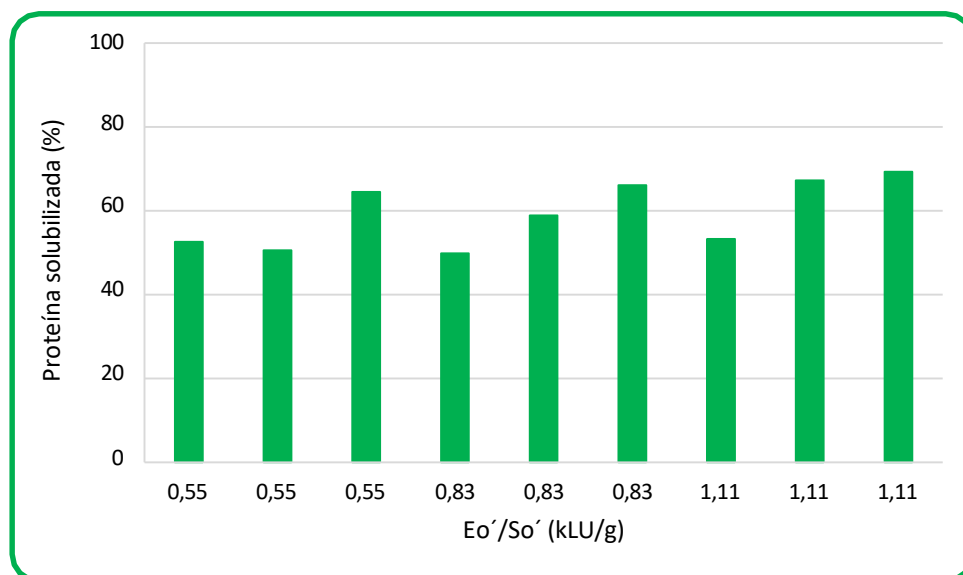


Figura 5.95.- Influencia de la relación Eo'/So' en el porcentaje de proteína solubilizada

Sin embargo, el porcentaje de colágeno no hidrolizado disminuye cuando aumenta la relación E_o'/S_o' dentro del intervalo estudiado (figura 5.96).

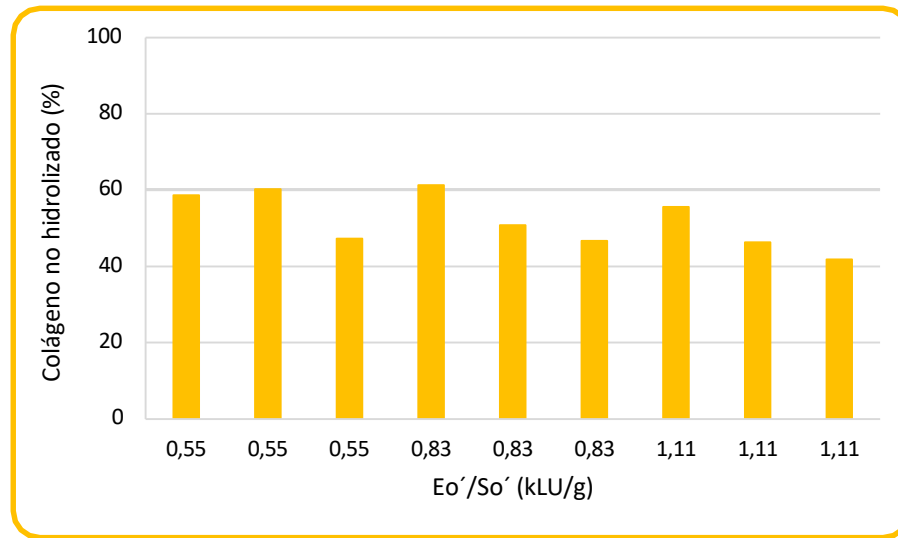


Figura 5.96.- Influencia de la relación E_o'/S_o' en el porcentaje de colágeno no hidrolizado

Lo mismo ocurre con el porcentaje de residuos no solubilizados: se aprecia una tendencia a la disminución al incrementarse E_o'/S_o' de 0,55 a 1,11 kLU/g (figura 5.97).

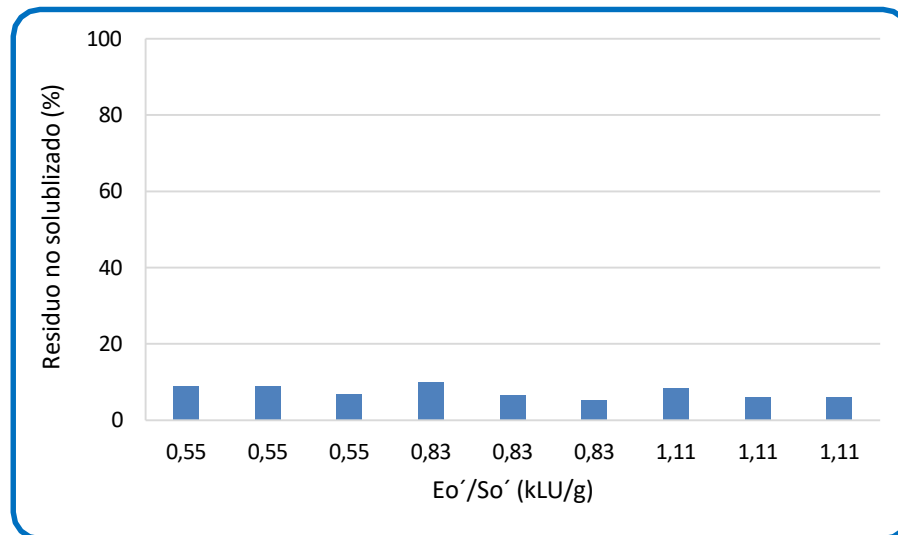


Figura 5.97.- Influencia de la relación E_o'/S_o' en el porcentaje de residuo no solubilizado

5.4.1.3. Influencia del pH

Uno de los factores importantes que controlan la hidrólisis enzimática es el valor de pH de la solución, ya que juega un papel decisivo en la actividad de la enzima, tanto de la Alcalase como de la Resinase. Para analizar este hecho se realizaron una serie de experimentos de hidrólisis en el intervalo de pH entre 7,5 y 8,5.

La influencia del pH en la recuperación de lípidos sigue una tendencia irregular. Se observa un cierto descenso entre pH = 7,5 y pH = 8,0 y un ligero aumento para pH = 8,5 (figura 5.98).

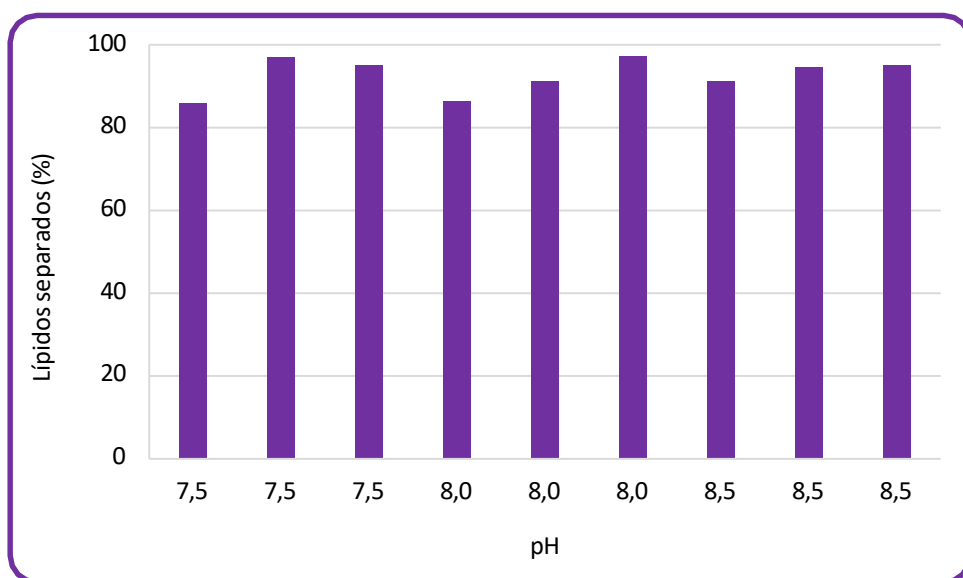


Figura 5.98.- Influencia del pH en el porcentaje de lípidos recuperados

En la solubilización de proteínas este comportamiento es mucho más marcado observándose en general, para pH = 8,0, los valores más bajos (figura 5.99).

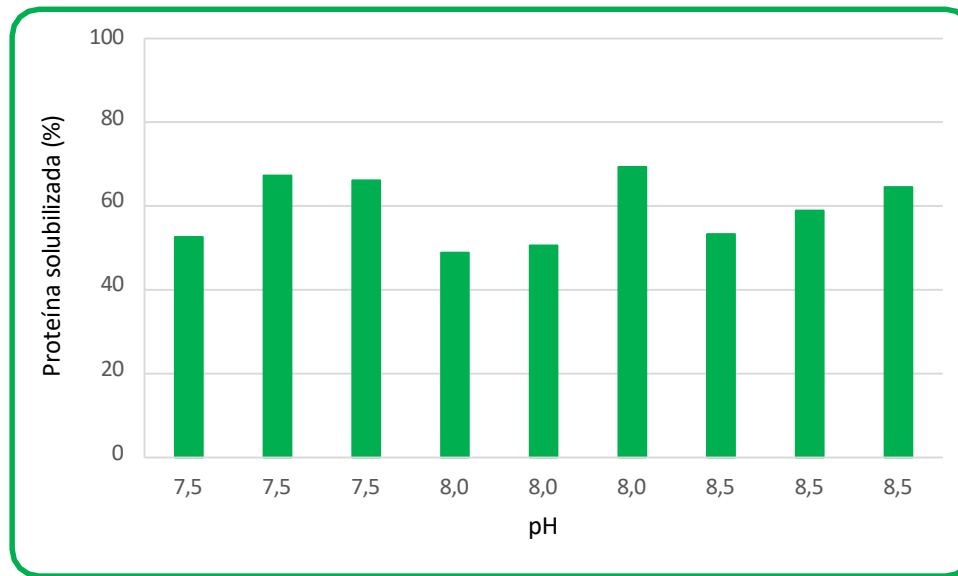


Figura 5.99.- Influencia del pH en el porcentaje de proteína solubilizada

En la figura 5.100 se puede apreciar el efecto del pH en el porcentaje de colágeno no hidrolizado. La tendencia también es bastante irregular, aunque parece mostrar un valor ligeramente mayor para el valor de pH intermedio analizado.

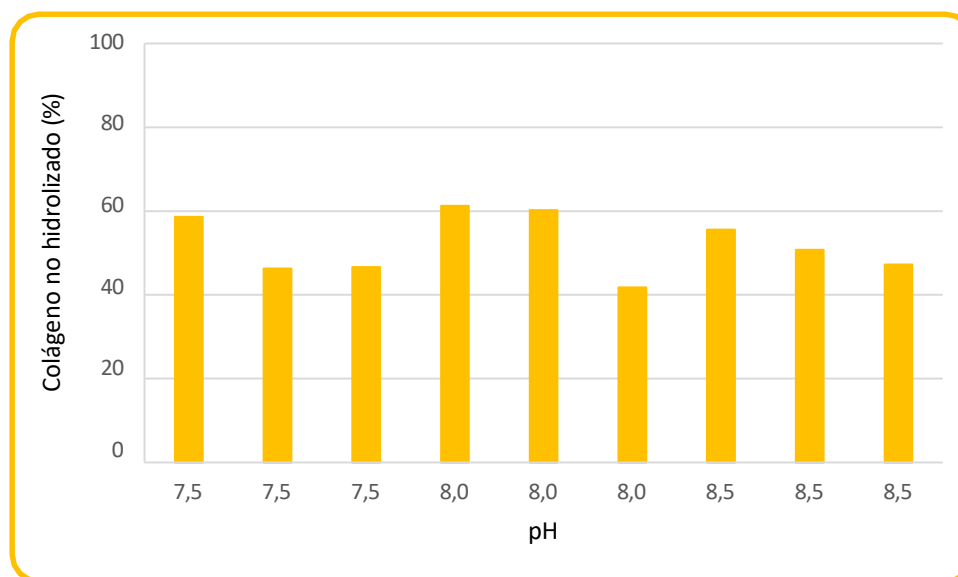


Figura 5.100.- Influencia del pH en el porcentaje de colágeno no hidrolizado

Análogo efecto se aprecia en el porcentaje de residuo no solubilizado (figura 5.101) en el que, sin haber claras variaciones, podría considerarse que el pH de 8,0 genera una mayor cantidad de residuos.

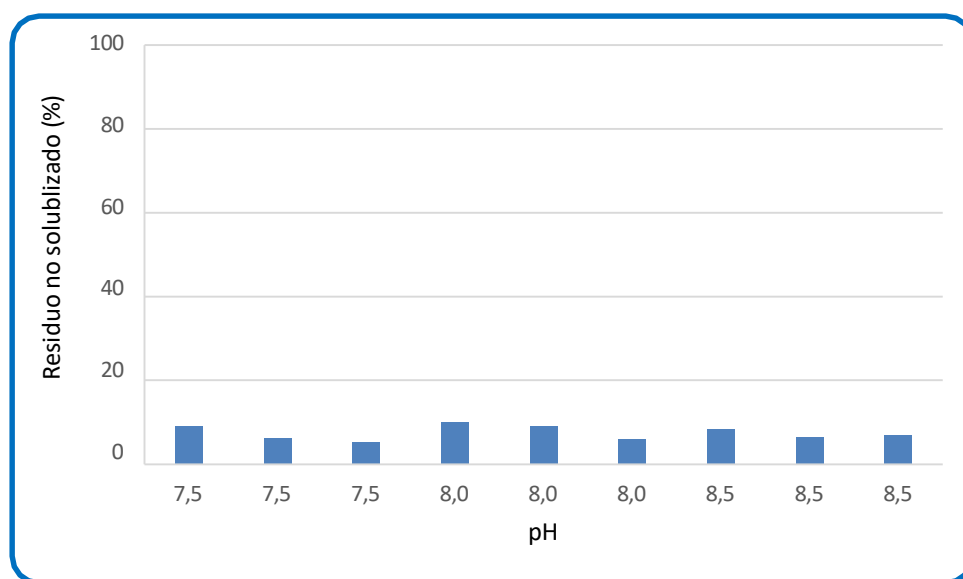


Figura 5.101.- Influencia del pH en el porcentaje de residuo no solubilizado

5.4.1.4. Influencia de la temperatura

La temperatura de reacción también es un factor importante en el control de la hidrólisis enzimática, ya que influye en la actividad de las enzimas estudiadas: Alcalase y Resinase. La influencia de este factor se analizó llevando a cabo hidrólisis a tres temperaturas: 45, 50 y 55°C.

El efecto de la temperatura sobre el porcentaje de lípidos recuperados (figura 5.102) es reducido, permaneciendo ese porcentaje más o menos constante en todo apreciándose un reducidísimo incremento a 50°C.

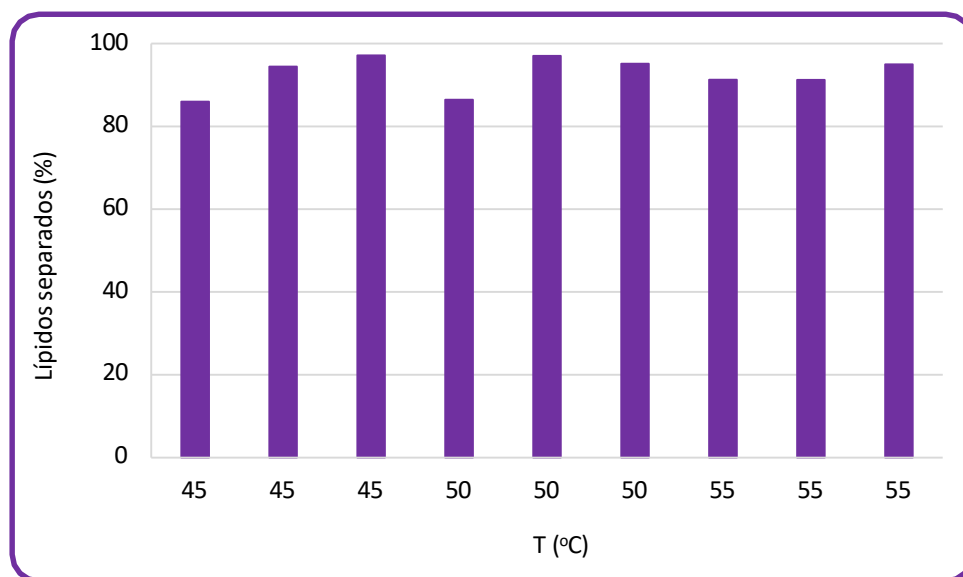


Figura 5.102.- Influencia de la temperatura en el porcentaje de lípidos recuperados

La respuesta del porcentaje de proteína solubilizada a la temperatura es diferente, observándose un valor medio más o menos constante para 45-50°C y una disminución a temperaturas superiores (figura 5.103).

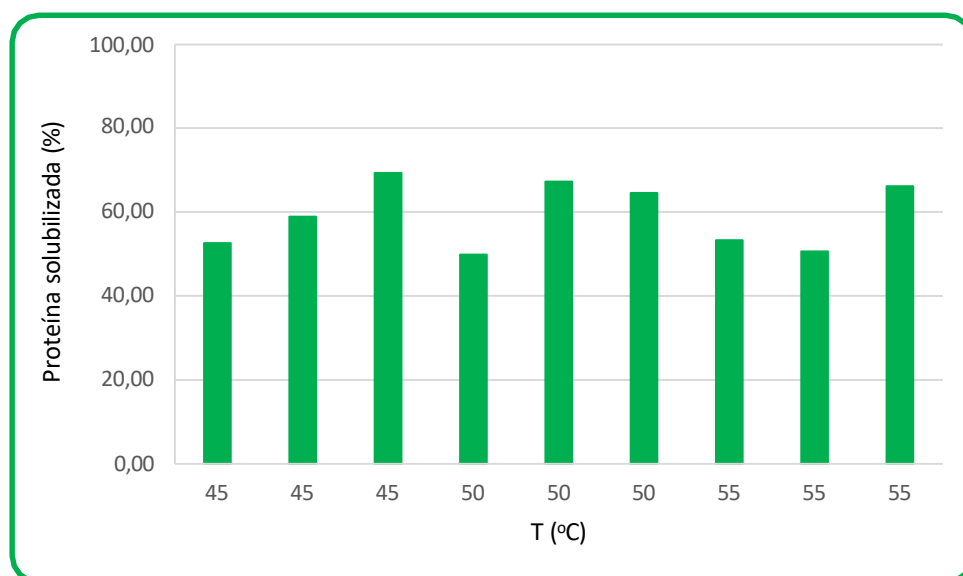


Figura 5.103.- Influencia de la temperatura en el porcentaje de proteína solubilizada

Según la figura 5.104, que refleja la influencia de la temperatura en el porcentaje de colágeno no hidrolizado, el efecto es bastante irregular no pudiendo observarse una tendencia clara en esa gráfica.

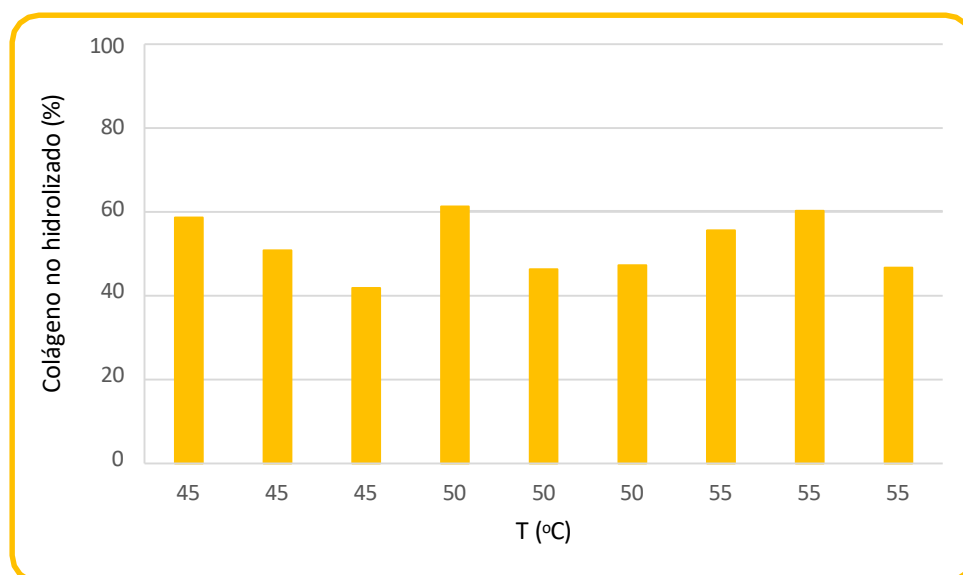


Figura 5.104.- Influencia de la temperatura en el porcentaje de colágeno no hidrolizado

Lo mismo ocurre en la figura 5.105, en la que se representa el efecto de la temperatura en el porcentaje de residuo no solubilizado.

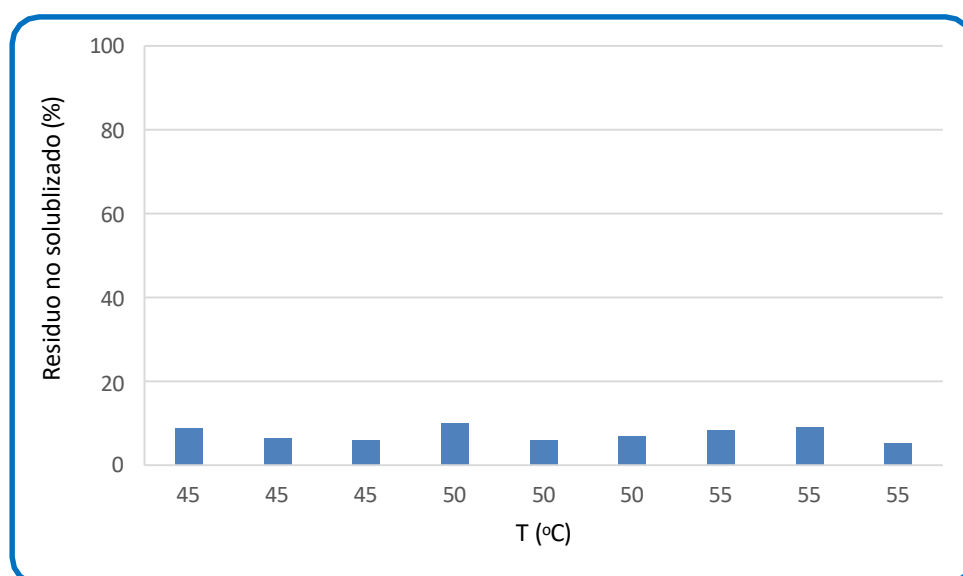


Figura 5.105.- Influencia de la temperatura en el porcentaje de residuo no solubilizado

5.4.2. Índice Señal/Ruido

Con el fin de observar con más claridad el efecto de cada factor sobre las variables a optimizar, se ha estudiado la relación señal/ruido (Signal to Noise) (S/N).

Para los porcentajes de solubilización de proteína, de colágeno no hidrolizado y de lípidos separados la relación S/N se calculó utilizando criterios de "mayor-mejor" de acuerdo con la ecuación (Pagura et al., 2009):

$$S_N = -10 \log \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right) \quad \text{Ec. 5.60}$$

y para el porcentaje de residuo no solubilizado la relación S/N se calculó utilizando criterios de "menor-mejor" de acuerdo con esta otra ecuación (Pagura et al., 2009):

$$S_N = -10 \log \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2 \right) \quad \text{Ec. 5.61}$$

donde n es el número de pruebas en un experimento e y_i es la respuesta experimental a la i -repetición.

En los diseños de Taguchi, la relación S/N es una medida de robustez utilizada para identificar los factores de control que reducen la variabilidad de un producto o proceso minimizando los efectos de los factores incontrolables. Los factores de control son aquellos parámetros de diseño y de proceso que pueden ser controlados, sin embargo, los factores de ruido no pueden controlarse durante el proceso que se quiere optimizar.

Los valores más elevados de la relación señal-ruido (S/N) permiten identificar los ajustes de los factores de control que minimizan los efectos de los factores de ruido.

A nivel estadístico, la relación S/N considera tanto la media como la variabilidad del muestreo o, expresado de otro modo, la relación S/N es la proporción de la media (señal) y la desviación estándar (ruido).

Si bien hay diferentes criterios para optimizar la función objetivo de S/N (mayor-mejor, menor-mejor, nominal-mejor, etc.) la manera de interpretar los resultados siempre

es la misma: cuanto mayor sea el valor de la relación S/N, mejor será el resultado obtenido.

Partiendo de esos criterios de optimización se obtiene, para cada factor estudiado, un rango de valores para la relación S/N (delta) de modo que un rango mayor significa una mayor influencia de ese factor respecto a los demás en las variables a optimizar seleccionadas.

5.4.2.1. Proteína solubilizada

Los valores de relación S/N de cada experimento para el porcentaje de proteína solubilizada se muestran en la tabla 5.34.

Tabla 5.34.- Relación S/N para el porcentaje de proteína solubilizada

Nº experimento	Relación S/N
1	34,42
2	33,95
3	34,54
4	34,08
5	35,40
6	36,56
7	36,20
8	36,41
9	36,82

Según la tabla 5.35, el valor más alto de delta (amplitud del intervalo para las distintas S/Ns de un factor) es el correspondiente a la relación Eo/So, seguido por la relación Eo'/So', pH y temperatura.

Tabla 5.35.- Respuesta para relaciones de señal a ruido en el porcentaje de proteína solubilizada

Niveles	Eo/So (UA/g)	Eo'/So' (kLU/g)	pH	T (°C)
N1	34,30	34,90	35,79	35,55
N2	35,35	35,25	34,95	35,57
N3	36,47	35,97	35,38	35,01
Delta	2,17	1,07	0,84	0,56
Rango	1	2	3	4

Esto significa que la relación Eo/So tiene la mayor influencia en la solubilización de proteína, ya que un cambio en el factor causa un impacto mayor en la solubilización de proteína, dando como resultado un mayor rango de la relación S/N (delta). Esta tendencia se puede observar claramente en figura 5.106.

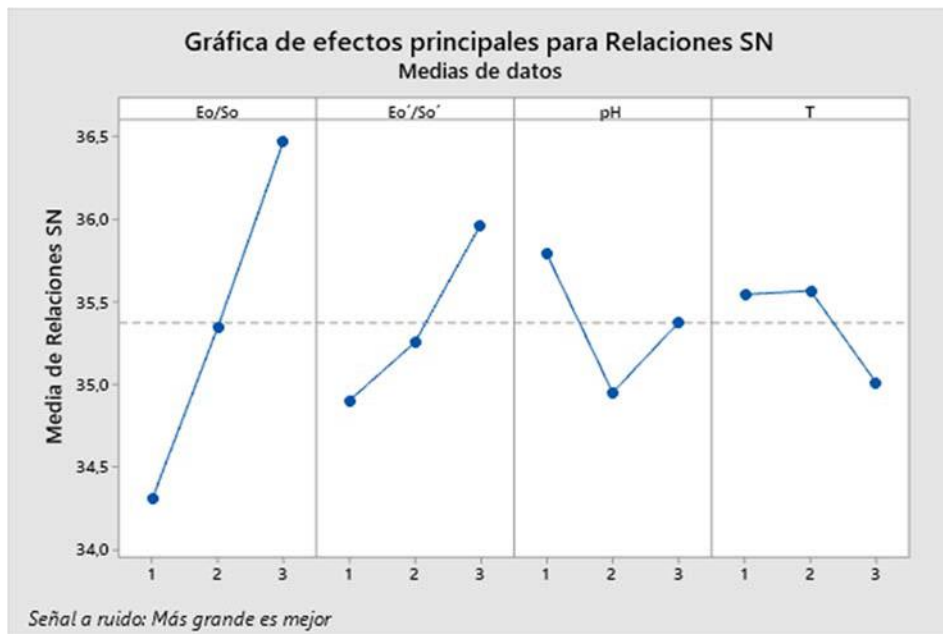


Figura 5.106. Efectos de los parámetros del proceso en el porcentaje de proteína solubilizada

Una de las primeras conclusiones que se pueden sacar de este estudio es que es evidente que la cantidad de hidrolizado proteico producido (representado como ya se indicó anteriormente por el porcentaje de proteína solubilizada) puede aumentarse incrementando las concentraciones de iniciales proteasa o disminuyendo las concentraciones iniciales de sustrato proteico (lo que corresponde a mayores valores de Eo/So).

Otra conclusión que puede obtenerse es que la utilización de lipasas también favorece, aunque de una manera indirecta, la producción de hidrolizados proteicos ya que la relación Eo'/So' es el segundo factor de influencia en el proceso de la hidrólisis del residuo cárnico con proteasa y lipasa conjuntamente. Se puede apreciar en la figura 5.106 que ese efecto, aunque notable, es menos marcado que en el caso de Eo/So. Ello es debido a que, como se ha indicado, el efecto es indirecto pues lo que ocurre es que, al hidrolizarse los lípidos, liberan la proteína que así tiene mayor facilidad para hidrolizarse.

En cambio, el pH y la temperatura parecen tener menor influencia cuando se trabaja con la mezcla. Se puede apreciar en la figura 5.106 cómo el pH de 8,0 es el nivel menos significativo aumentando la influencia a pH menor o mayor. También se aprecia como entre 45 y 50°C la temperatura no es muy significativa pero que, a valores mayores, su significación aun es menor. Este efecto es diferente al obtenido cuando se trabajaba con las enzimas por separado: en esos casos se obtenía más proteína solubilizada con el aumento de pH o con la disminución de temperatura.

Lamentablemente, estos resultados no han podido ser contrastados con la bibliografía ya que no existen estudios que hayan utilizado mezclas de proteasas y lipasas en la hidrólisis de mezclas de proteínas y lípidos.

5.4.2.2. Lípidos separados

En la tabla 5.36 están incluidos los valores de relación S/N para el porcentaje de lípidos separados en cada uno de los experimentos realizados.

Tabla 5.36.- Relación S/N para el porcentaje de lípidos separados

Nº experimento	Relación S/N
1	38,69
2	38,73
3	39,21
4	39,20
5	39,50
6	39,74
7	39,57
8	39,55
9	39,75

Como puede observarse en la tabla 5.37, en función del rango de S/N y los valores delta, una vez más la relación Eo/So y la relación Eo'/So' ejercen la mayor influencia sobre el porcentaje de separación de lípidos, seguidas del pH y la temperatura.

Tabla 5.37.- Respuesta para relaciones de señal a ruido en el porcentaje de lípidos recuperados

Niveles	Eo/So (UA/g)	Eo'/So' (kLU/g)	pH	T (°C)
N1	38,87	39,15	39,32	39,31
N2	39,48	39,26	39,23	39,35
N3	39,62	39,56	39,43	39,32
Delta	0,75	0,41	0,2	0,03
Rango	1	2	3	4

Esto es debido a que un cambio en el factor de relación Eo/So o Eo'/So' causa un mayor efecto en el porcentaje de separación de lípidos, lo que resulta en un rango de la relación S/N más grande (delta). La evolución del efecto de los parámetros del proceso en el porcentaje de separación de lípidos se presenta en la figura 5.107.

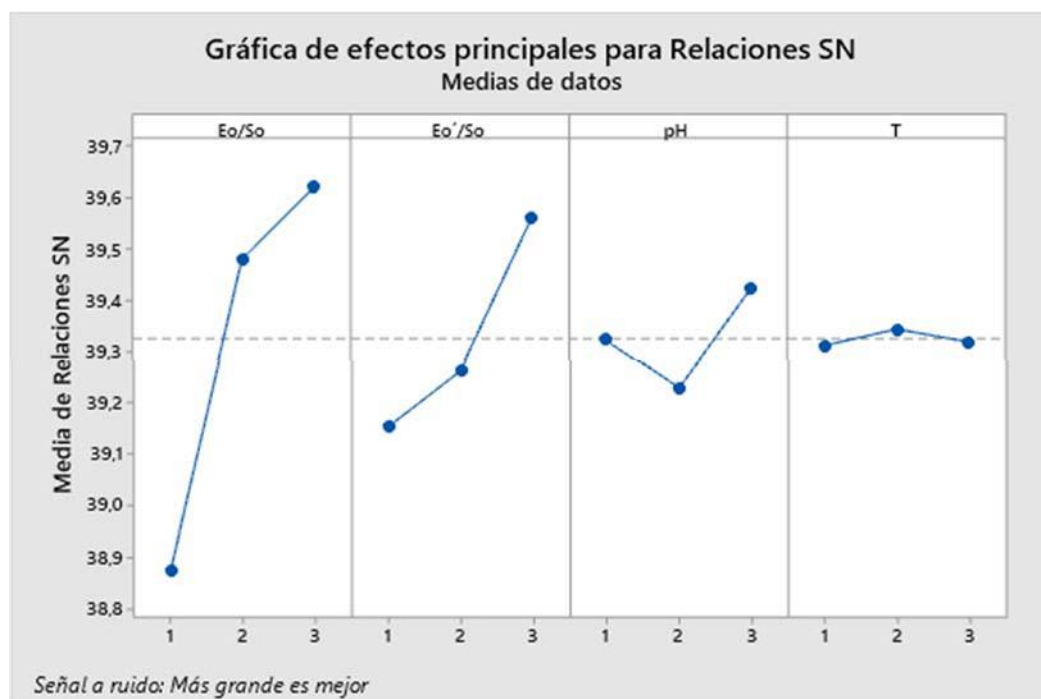


Figura 5.107. Efectos de los parámetros del proceso en el porcentaje de lípidos recuperados

Los efectos de las relaciones Eo/So y Eo'/So' en el porcentaje de lípidos recuperados son análogos a los obtenidos para el porcentaje de proteína solubilizada. El aumento de estos parámetros favorece la cantidad de lípidos recuperados.

La cantidad de ácidos grasos libres producidos (representados como también se indicó anteriormente por el porcentaje de lípidos separados) puede incrementarse con el aumento de las concentraciones de iniciales lipasa o la disminución de las concentraciones iniciales de sustrato lipídico (valores más altos de Eo'/So').

La presencia de proteasas en el medio de hidrólisis también favorece, como se aprecia en la figura 5.107, la producción de ácidos grasos libres. La justificación de este fenómeno parece radicar en el hecho que, al hidrolizarse la proteína con la proteasa, deja más accesibles los lípidos para ser hidrolizados a su vez.

En cuanto a la influencia del pH y la temperatura en el porcentaje de lípidos recuperados resulta ser mucho menor que la de Eo/So y Eo'/So'. Especialmente, en el caso de la temperatura, el efecto es muy pequeño. También aquí se aprecia un efecto del pH menos significativo para 8,0. El comportamiento es distinto al correspondiente a los

estudios con las enzimas por separado: en esos estudios se apreciaba un aumento en la cantidad de lípidos recuperados al aumentar el pH o al disminuir la temperatura mientras que con la mezcla de Alcalase y Resinase se produce la menor cantidad de ácidos grasos libres a un pH de 8 y la cantidad producida apenas varía entre 45 y 55°C.

5.4.2.3. Colágeno no hidrolizado

La tabla 5.38 muestra los valores de relación S/N para el porcentaje de colágeno no hidrolizado en los experimentos llevados a cabo.

Tabla 5.38-. Relación S/N para el porcentaje de colágeno no hidrolizado

Nº experimento	Relación S/N
1	35,37
2	35,75
3	34,90
4	35,60
5	34,12
6	33,31
7	33,49
8	33,38
9	32,43

Como puede observarse en la tabla 5-39, de acuerdo con el rango de relación S/N y los valores delta, la relación Eo/So es la que ejerce mayor influencia en la recuperación de colágeno no hidrolizado, seguida por la relación Eo'/So', la temperatura y el pH.

Tabla 5.39.- Respuesta para relaciones de señal a ruido en el porcentaje de colágeno no hidrolizado

Niveles	Eo/So (UA/g)	Eo'/So' (kLU/g)	pH	T (°C)
N1	35,34	34,82	34,02	33,97
N2	34,34	34,42	34,59	34,18
N3	33,1	33,55	34,17	34,63
Delta	2,24	1,27	0,57	0,66
Rango	1	2	4	3

Según esto, un cambio en el factor de relación Eo/So causa mayor impacto en la recuperación de colágeno no hidrolizado, lo que da como resultado un rango de la relación S/N más grande (mayor delta). Esta tendencia se puede observar claramente en la Figura 5-108.

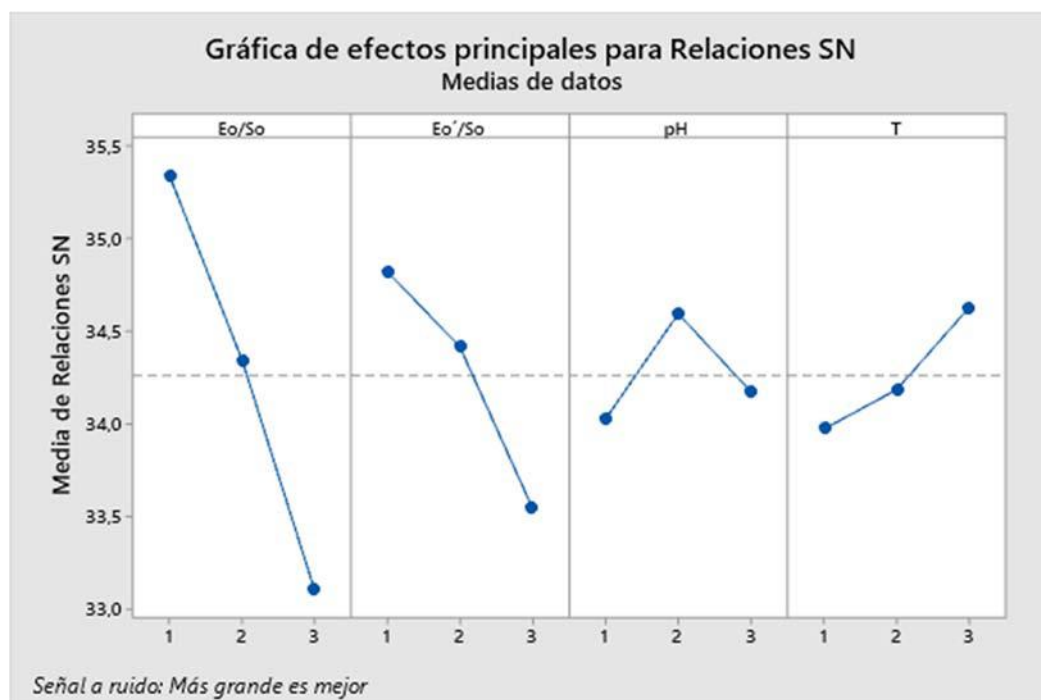


Figura 5.108. Efectos de los parámetros del proceso en el porcentaje de colágeno no hidrolizado

Como cabía esperar el efecto de los factores de control en el porcentaje de colágeno no hidrolizado es el opuesto al ejercido sobre el porcentaje de proteína solubilizada distinta del colágeno dado el diferente comportamiento de esta proteína fibrosa frente al resto de las proteínas globulares presentes en los residuos cárnicos estudiados.

De acuerdo con los resultados que aparecen en la gráfica anterior de efectos principales, puede incrementarse la cantidad colágeno no hidrolizado disminuyendo las concentraciones iniciales de proteasa o aumentando las concentraciones iniciales de sustrato proteico, es decir, reduciendo el valor de E_0/S_0 .

En este caso el factor E_0'/S_0' también influye de manera importante, aunque menos destacada que el factor E_0/S_0 , en la recuperación colágeno no hidrolizado ya que es el segundo factor de influencia dentro de los estudiados. El efecto de E_0'/S_0' sobre la cantidad de colágeno recuperado es negativa y es consecuencia de que la hidrólisis de los lípidos libera el colágeno que así tiene mayor posibilidad para hidrolizarse.

La influencia de la temperatura es menor que las de E_0/S_0 y E_0'/S_0' pero superior a la del pH. El efecto de la temperatura coincide con el obtenido al trabajar solo con Alcalase donde se recuperaba más colágeno no hidrolizado con el aumento de la temperatura, aunque difiere con el obtenido al trabajar solo con Resinase donde la cantidad de colágeno recuperada no estaba influida por la temperatura. El efecto del pH difiere tanto del obtenido en los estudios con Alcalase sola como del obtenido en los estudios con Resinasa sola ya que, en los primeros, la disminución de pH favorecía la recuperación de colágeno no hidrolizado y, en los segundos, el pH no afectaba a la misma, mientras que al trabajar con una combinación de ambas enzimas se obtiene una producción máxima de colágeno no hidrolizado para un pH de 8,0.

5.4.2.4. Residuo no solubilizado

Se pueden observar en la tabla 5.40 los valores de la relación S/N para el porcentaje de residuo no solubilizado en los experimentos llevados a cabo.

Tabla 5.40.- Relación S/N para el porcentaje de residuo no solubilizado

Nº experimento	Relación S/N para el porcentaje de residuo no solubilizado
1	-19,04
2	-20,02
3	-18,46
4	-19,09
5	-16,27
6	-15,69
7	-16,79
8	-14,45
9	-15,62

Según los valores de S/N, (tabla 5.41), la relación Eo/So es el factor que mayor efecto tiene sobre el porcentaje de residuo no solubilizado, con una influencia mucho mayor que los otros tres; en segundo lugar, se sitúa el pH, seguido de la relación Eo'/So', con una influencia similar al anterior y, por último, la temperatura.

Tabla 5.41.- Respuesta para relaciones de señal a ruido en el porcentaje de residuo no solubilizado

Niveles	Eo/So (UA/g)	Eo'/So' (kLU/g)	pH	T (°C)
N1	-19,17	-18,31	-16,39	-16,98
N2	-17,02	-16,91	-18,25	-17,5
N3	-15,62	-16,59	-17,17	-17,33
Delta	3,55	1,72	1,85	0,52
Rango	1	3	2	4

En la Figura 5-109 se pueden observar los efectos de los parámetros de operación sobre las tendencias en el porcentaje de residuo no solubilizado.

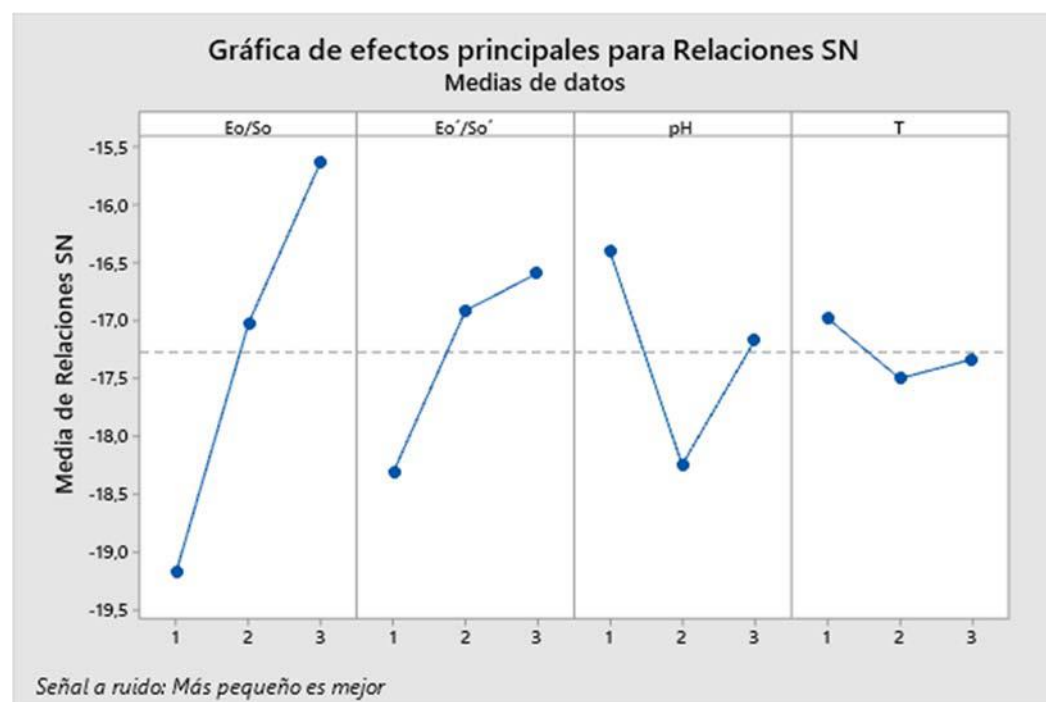


Figura 5.109. Efectos de los parámetros del proceso en el porcentaje de residuo no solubilizado

Cualquier cambio en el factor de relación Eo/So causa un impacto importante en la insolubilización del residuo que se ve incrementada para valores bajos de Eo/So correspondientes a bajas concentraciones iniciales de proteasa o altas concentraciones iniciales de sustrato proteico.

El efecto del factor Eo'/So', aunque mucho menor que el de Eo/So e incluso inferior al del pH, también es importante, existiendo una relación inversa entre el mismo y la cantidad de residuo no solubilizado que recomienda trabajar con concentraciones iniciales de lipasa altas o concentraciones iniciales de sustrato lipídico bajas si se desea que esa cantidad sea lo más baja posible.

La influencia del pH es la más importante después de la de la relación Eo/So. Su efecto es diferente al alcanzado en los estudios realizados con las enzimas por separado en los que los pHs más altos reducían la cantidad de residuo no solubilizado. Sin embargo, al utilizar una combinación de Alcalase y Resinase, se obtiene una máxima producción de residuo no solubilizado a un pH de 8,0.

El efecto de la temperatura es el menor de todos siendo más significativo en el intervalo de 45-50°C y alcanzado la máxima significación para 50°C. También aquí se observa una discrepancia con la utilización de proteasa y lipasa individualmente ya que, en esos experimentos, se obtenía mayor cantidad de residuo no solubilizado al aumentar la temperatura y, con la mezcla, se obtiene un máximo a 50°C.

3. Superficie de respuesta

Con la finalidad de evaluar la influencia de los parámetros individuales y sus interacciones, así como llevar a cabo la optimización de las condiciones de hidrólisis se utilizó el método de superficie de respuesta.

Para ello se hizo un ajuste cuadrático con interacción de variables para obtener una ecuación que relacione cada una de las variables a optimizar con los factores de control examinando posteriormente la ecuación obtenida en función de un análisis de varianza ANOVA para el modelo experimental empleado. El análisis de varianza ANOVA permite decidir qué factores o interacciones son más significativos en el ajuste de la variable de respuesta y si el modelo es adecuado para describir la variable de respuesta representando adecuadamente una correlación entre las variables estudiadas.

Se ha utilizado el diagrama de Pareto o de efectos estandarizados como expresión gráfica de los resultados del test ANOVA. Este diagrama consiste en un gráfico de barras, una por cada factor individual, una por cada factor al cuadrado y una por cada interacción de factores. La influencia puede ser positiva (signo positivo en la ecuación de regresión) o negativa (signo negativo en la ecuación de regresión) sobre la variable objetivo. Las líneas verticales marcan el límite de significatividad que se corresponde con un valor de p de 0,05. Aquellos factores que la sobrepasen son estadísticamente significativos, mientras que aquellos que queden por debajo no se puede considerar que sean influyentes al 95 % de confianza.

1. Proteína solubilizada

El ajuste cuadrático con interacción de variables para la proteína solubilizada dio la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Porcentaje de proteína solubilizada} = & 326,00 + 584,00 \cdot Eo/So + 183,10 \cdot Eo'/So' - 69,20 \cdot \\ & H - 3,85 \cdot T - 97,40 \cdot Eo/So \cdot Eo/So - 12,17 \cdot Eo'/So' \cdot Eo'/So' + 3,5 \cdot pH \cdot pH - 0,01 \cdot T \cdot T - \\ & 16,9 \cdot Eo/So \cdot Eo'/So' - 45,20 \cdot Eo/So \cdot pH - 1,28 \cdot Eo/So \cdot T - 18,30 \cdot Eo'/So' \cdot pH - \\ & 0,13 \cdot Eo'/So' \cdot T + 0,63 \cdot pH \cdot T \end{aligned}$$

Ec. 5.62

En la tabla 5.42 se muestran los resultados obtenidos a partir del análisis de varianza para el modelo experimental empleado.

Tabla 5.42.- Análisis de varianza para el porcentaje de proteína solubilizada

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor p
Modelo	14	5565,49	397,535	44,89	0,000
Lineal	4	1585,64	396,411	44,76	0,000
Eo/So	1	420,37	420,366	47,47	0,000
Eo'/So'	1	19,21	19,208	2,17	0,152
pH	1	24,75	24,747	2,79	0,106
T	1	12,76	12,764	1,44	0,240
Cuadrado	4	266,27	66,568	7,52	0,000
Eo/So*Eo/So	1	183,82	183,821	20,76	0,000
Eo'/So'*Eo'/So'	1	60,16	60,162	6,79	0,014
pH*pH	1	41,68	41,676	4,71	0,039
T*T	1	6,10	6,095	0,69	0,414
Interacción de 2 factores	6	228,43	38,072	4,3	0,003
Eo/So*Eo'/So'	1	6,45	6,453	0,73	0,401
Eo/So*pH	1	46,19	46,186	5,22	0,030
Eo/So*T	1	4,00	3,997	0,45	0,507
Eo'/So'*pH	1	214,23	214,233	24,19	0,000
Eo'/So'*T	1	1,22	1,216	0,14	0,714
pH*T	1	8,80	8,80	0,99	0,327
Error	28	247,97	8,856		
Falta de ajuste	24	247,97	10,332	38745,47	0,000
Error puro	4	0,00	0,000		
Total	42	5813,47			

El valor de F elevado de 44,89 y la probabilidad de $0,00 < 0,05$ implica que el modelo es significativo, lo que indica que la ecuación del modelo describe apropiadamente la superficie de respuesta con respecto al porcentaje de proteína solubilizada en el intervalo de la investigación.

Los valores de probabilidad (valor p) de los factores del modelo así como de sus interacciones inferiores a 0,05 indican que son significativos. Para este caso los términos que tienen mayor efecto en la variable de respuesta (figura 5.110) son (Eo/So), (Eo/So-Eo/So), (Eo'/So'-Eo'/So'), (pH·pH), (Eo/So·pH) y (Eo'/So'·pH), siendo (Eo/So), (Eo/So-Eo/So) y (Eo'/So'·pH) (probabilidad=0,000) los términos que más influyen en

la solubilidad de la proteína. Los valores p superiores a 0,05 indican los términos de modelo no significativos.

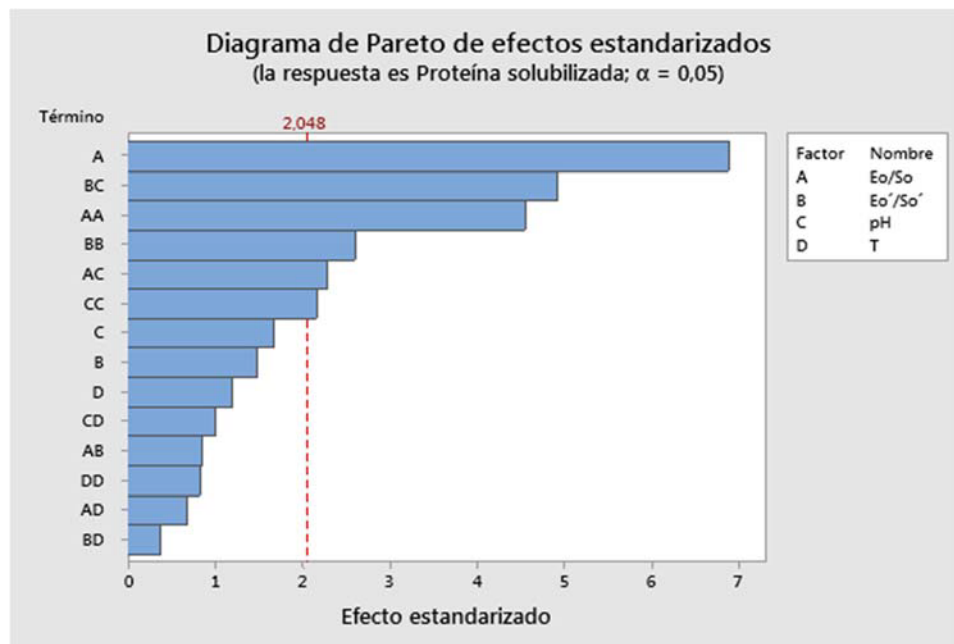


Figura 5.110. Diagrama de Pareto para el porcentaje de proteína solubilizada

Se puede comprobar la bondad del ajuste mediante una representación de los valores del porcentaje de proteína solubilizada calculados a partir de la ecuación frente a los observados experimentalmente (figura 5.111).

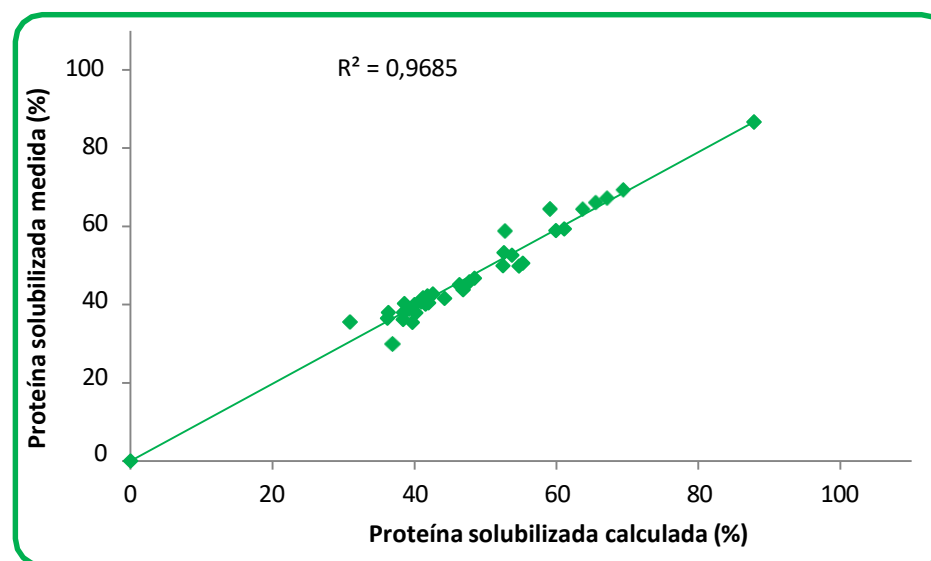


Figura 5.111. Representación del porcentaje de proteína solubilizada calculado frente al obtenido experimentalmente

El coeficiente de determinación R^2 obtenido de 0,9685 indica, una vez más, que el modelo es adecuado para describir la variable de respuesta y representa convenientemente una correlación entre las variables de estudio. Además, señala que el 96,85 % de la variabilidad es explicada por el modelo y sólo el 3,15 % no lo es o fue un resultado de la casualidad.

Una vez se tiene una ecuación que liga el porcentaje de proteína solubilizada con las variables de proceso, se puede optimizar el valor de la superficie de respuesta. En las figuras 5.112 y 5.113 aparecen las gráficas de superficie de respuesta y de contorno de los parámetros estudiados combinados de dos en dos. En cada caso se ha optado por fijar los parámetros no analizados en un valor medio ($E_o/S_o = 0,405$ UA/g, $E_o'/S_o' = 0,595$ kLU/g, pH = 8,0 y T = 50°C). Al examinar las gráficas se puede observar que la superficie donde se maximiza el porcentaje de proteína solubilizada:

- Para pH = 8,0 y T = 50°C está comprendida en el rango de valores de E_o/S_o entre 0,65 y 0,80 UA/g y valores de E_o'/S_o' entre 0,40 y 1,20 kLU/g. De la gráfica de contorno se deduce que el proceso es más sensible a los cambios de E_o/S_o que a los de E_o'/S_o' .
- Para $E_o'/S_o' = 0,595$ kLU/g y T = 50°C está comprendida en el rango de valores de pH entre 7,0 y 8,0 y valores de E_o/S_o entre 0,60 y 0,80 UA/g; los valores más bajos de pH permiten trabajar a relaciones de E_o/S_o más bajas (0,40-0,6 UA/g).
- Para $E_o'/S_o' = 0,595$ kLU/g y pH = 8,0 está comprendida en el rango de valores de temperatura entre 40 y 50°C y valores de E_o/S_o entre 0,60 y 0,80 UA/g; las temperaturas más bajas (40°C) permiten trabajar con relaciones de E_o/S_o inferiores (0,45-0,60 UA/g).
- Para $E_o/S_o = 0,405$ UA/g y T = 50°C está comprendida en el rango de valores de pH entre 7,0 y 7,5 y valores de E_o'/S_o' entre 0,80 y 1,20 kLU/g; los valores más bajos de pH permiten trabajar a relaciones de E_o/S_o más bajas (0,45-0,80 UA/g)
- Para $E_o/S_o = 0,405$ UA/g y pH = 8,0 se alcanza para valores de temperatura inferiores a 40°C y valores de E_o'/S_o' superiores a 1,2 kLU/g.

- Para $Eo/So = 0,405$ UA/g y $Eo'/So' = 0,595$ kLU/g se alcanza para valores de temperatura entre 40°C y 50°C y valores de pH entre 7,0 y 7,3; temperaturas en torno a 40°C permiten trabajar con valores de pH más altos (hasta 7,8).

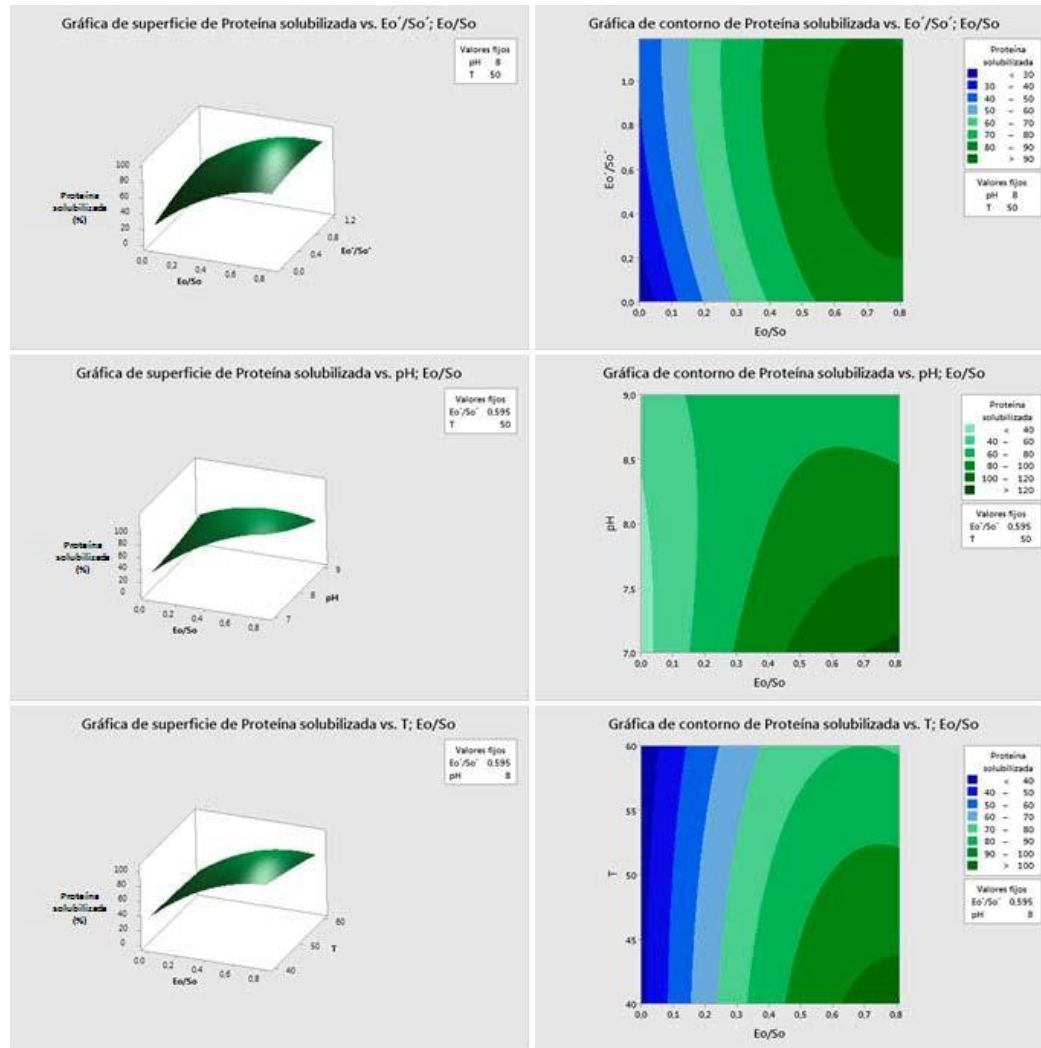


Figura 5.112. Gráficas de superficie de respuesta y de contorno para el porcentaje de proteína solubilizada mostrando los efectos de la interacción de Eo/So - Eo'/So' , Eo/So -pH y Eo/So -T

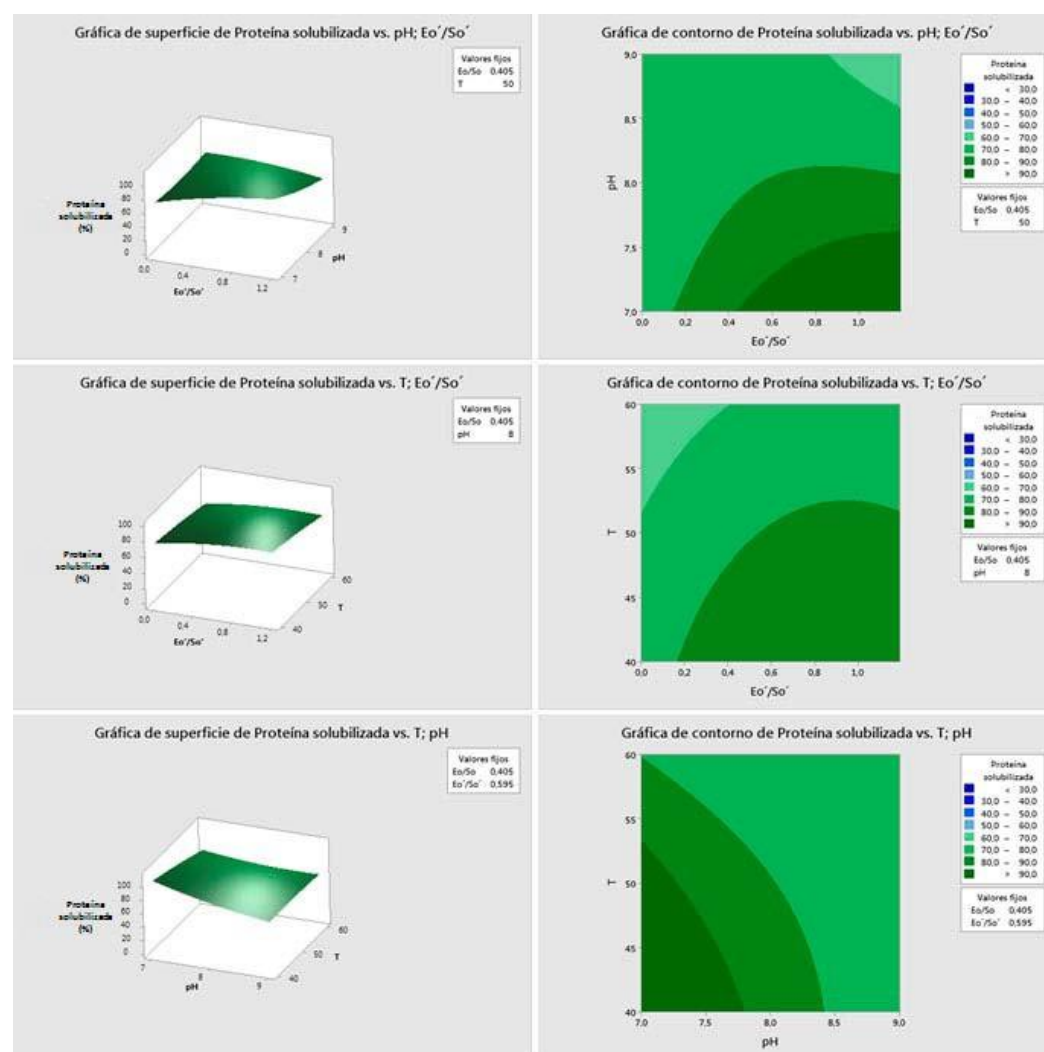


Figura 5.113. Gráficas de superficie de respuesta y de contorno para el porcentaje de proteína solubilizada mostrando los efectos de la interacción de Eo/So'-pH y Eo'/So'-T y pH-T

Partiendo de los resultados obtenidos en las gráficas de superficie y de contorno, se ha optimizado el proceso para obtención de una producción de hidrolizado lo mayor posible: el objetivo es conseguir un porcentaje de proteína solubilizada máximo, es decir, del 100 % (figura 114).

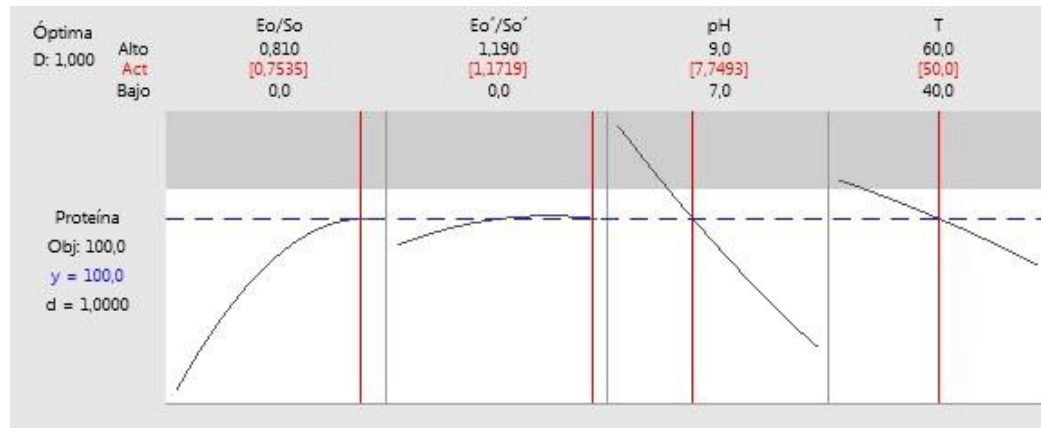


Figura 5.114. Gráficas de optimización de respuesta para el porcentaje de proteína solubilizada

Los valores optimizados para los parámetros estudiados aparecen en la tabla 5.43.

Tabla 5.43.- Configuración de las variables de proceso para obtención del máximo porcentaje de proteína solubilizada

Factor	Valor óptimo
Eo/So (UA/g)	0,75
Eo'/So' (kLU/g)	1,17
pH	7,75
T (°C)	50

5.4.3.2. Lípidos separados

El ajuste cuadrático con interacción de variables para los lípidos recuperados dio la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Porcentaje de lípidos recuperados} = & -348,00 + 957,00 \cdot Eo/So + 222,20 \cdot Eo'/So' + \\ & 69,90 \cdot pH + 1,71 \cdot T - 322,60 \cdot Eo/So \cdot Eo/So - 31,36 \cdot Eo'/So' \cdot Eo'/So' - 2,39 \cdot pH \cdot pH - \\ & 0,02 \cdot T \cdot T - 303,40 \cdot Eo/So \cdot Eo'/So' - 90,40 \cdot Eo/So \cdot pH + 2,15 \cdot Eo/So \cdot T - 17,55 \cdot Eo'/So' \cdot pH \\ & + 0,23 \cdot Eo'/So' \cdot T - 0,1 \cdot pH \cdot T \end{aligned}$$

Ec. 5.63

La tabla 5.44 muestra los resultados obtenidos a partir del análisis de varianza para el modelo experimental empleado.

Tabla 5.44.- Análisis de varianza para el porcentaje de lípidos recuperados

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor p
Modelo	14	6523,19	465,94	15,09	0,000
Lineal	4	1168,81	292,20	9,47	0,000
Eo/So	1	874,66	874,66	28,34	0,000
Eo'/So'	1	1107,01	1107,01	35,86	0,000
pH	1	108,39	108,39	3,51	0,071
T	1	5,92	5,92	0,19	0,665
Cuadrado	4	2022,69	505,67	16,38	0,000
Eo/So·Eo/So	1	2017,56	2017,56	65,36	0,000
Eo'/So'·Eo'/So'	1	399,52	399,52	12,94	0,001
pH·pH	1	19,42	19,42	0,63	0,434
T·T	1	14,92	14,92	0,48	0,493
Interacción de 2 factores	6	2371,88	395,31	12,81	0,000
Eo/So·Eo'/So'	1	2075,76	2075,76	67,25	0,000
Eo/So·pH	1	184,49	184,49	5,98	0,021
Eo/So·T	1	11,30	11,30	0,37	0,550
Eo'/So'·pH	1	197,12	197,12	6,39	0,017
Eo'/So'·T	1	3,75	3,75	0,12	0,730
pH·T	1	0,44	0,44	0,01	0,905
Error	28	864,31	30,87		
Falta de ajuste	24	864,31	36,01	2160781,81	0,000
Error puro	4	0,00	0,00		
Total	42	7387,50			

El valor de F de 15,09 y la probabilidad de $0,00 < 0,05$ indican que el modelo es significativo, por lo indica la ecuación del modelo describe de manera adecuada la superficie de respuesta con respecto al porcentaje de lípidos recuperados en el intervalo de parámetros investigado.

Los valores de probabilidad (valor p) de los factores del modelo así como de sus interacciones inferiores a 0,05 indican que son significativos. Para la recuperación de lípidos los términos que tienen mayor efecto en la variable de respuesta (figura 5.115) son (Eo/So), (Eo'/So'), (Eo/So·Eo/So), (Eo'/So'·Eo'/So'), (Eo/So·Eo'/So'), (Eo/So·pH)

y $(Eo'/So' \cdot pH)$, siendo (Eo/So) , (Eo'/So') , $(Eo/So \cdot Eo/So)$ y $(Eo/So \cdot Eo'/So')$ (probabilidad=0,000) los términos que más influyen en la recuperación de lípidos. Los valores p superiores a 0,05 indican los términos de modelo no significativos.

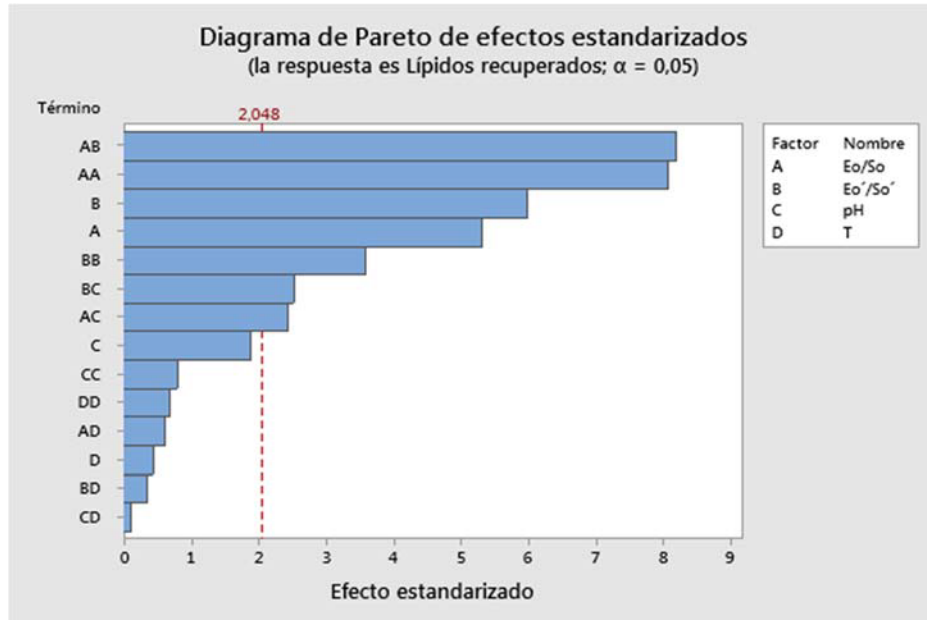


Figura 5.115. Diagrama de Pareto para el porcentaje de lípidos recuperados

La bondad del ajuste se ha comprobado mediante una representación de los valores del porcentaje de lípidos recuperados calculados a partir de la ecuación frente a los observados experimentalmente (figura 5.116).

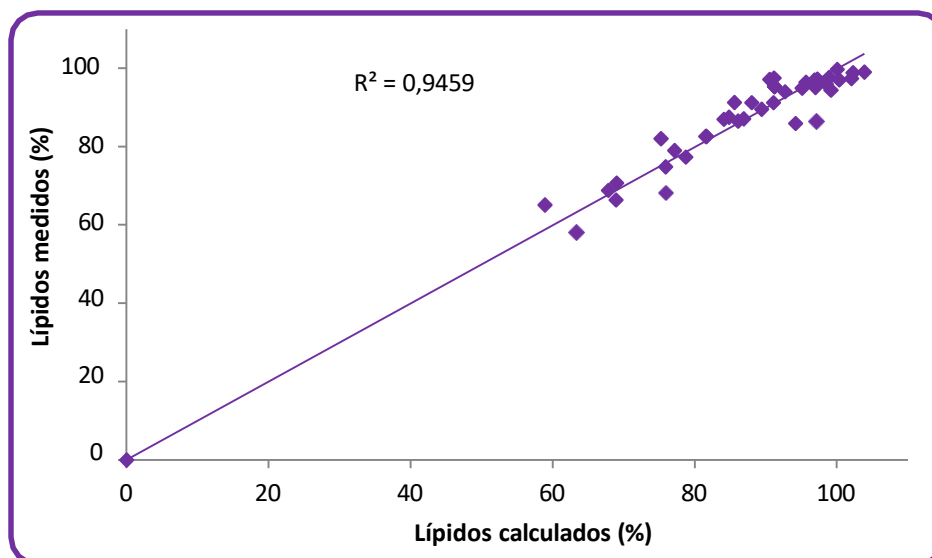


Figura 5.116. Representación del porcentaje de lípidos recuperados calculado frente al obtenido experimentalmente

El valor de 0,9459 obtenido para el coeficiente de determinación R^2 indica, de nuevo, que el modelo es adecuado para describir la variable de respuesta y representa convenientemente una correlación entre las variables de estudio. Además, señala que el 94,59 % de la variabilidad es explicada por el modelo y sólo el 5,41 % no lo es o fue un resultado de la casualidad.

A partir de la ecuación que liga el porcentaje de lípidos recuperados con las variables de proceso, se puede optimizar el valor de la superficie de respuesta. En las figuras 5.117 y 5.118 están representadas las gráficas de superficie de respuesta y de contorno de los parámetros estudiados combinados de dos en dos. También aquí se ha optado por fijar en cada caso los parámetros no analizados en un valor medio ($E_o/S_o = 0,405$ UA/g, $E_o'/S_o' = 0,595$ kLU/g, pH = 8,0 y T = 50°C). En las gráficas se puede observar que la superficie donde se alcanzan valores máximos en el porcentaje de lípidos recuperados:

- Para pH = 8,0 y T = 50°C se encuentra en un amplio margen de combinación de valores de E_o/S_o - E_o'/S_o' : así, fijando E_o/S_o en 0,20 UA/g, se obtienen máximas recuperaciones de lípidos independientemente de los valores de E_o'/S_o' y, fijando E_o'/S_o' en valores inferiores a 0,10 kLU/g se obtienen máximas recuperaciones de lípidos para valores de E_o/S_o superiores a 0,20 UA/g.
- Para $E_o'/S_o' = 0,595$ kLU/g y T = 50°C se encuentra en el intervalo de valores de pH entre 7,0 y 9,0 y valores de E_o/S_o entre 0,15 y 0,25 UA/g; valores más altos de E_o/S_o exigen trabajar a pH por debajo de 9,0 para obtener un máximo rendimiento.
- Para $E_o'/S_o' = 0,595$ kLU/g y pH = 8,0 se encuentra en el intervalo de valores de temperatura entre 40 y 55°C y valores de E_o/S_o entre 0,10 y 0,40 UA/g. Con valores próximos a 40°C se puede incluso trabajar con relaciones de E_o/S_o inferiores a 0,10 UA/g y obtener máximas cantidades de lípidos recuperados.
- Para $E_o/S_o = 0,405$ UA/g y T = 50°C se encuentra en el intervalo de valores de pH entre 7,0 y 9,0 y valores de E_o'/S_o' inferiores a 0,30 kLU/g; valores

más altos de E_o/S_o' (0,30-0,80 UA/g) exigen trabajar con pH más próximo a 7,0.

- Para $E_o/S_o = 0,405$ UA/g y pH = 8,0 se encuentra en el intervalo de 40°C-60°C de temperatura y valores de E_o/S_o' inferiores a 0,50 kLU/g.
- Para $E_o/S_o = 0,405$ UA/g y $E_o/S_o' = 0,595$ kLU/g se encuentra en el intervalo entre 40°C y 60°C para valores de temperatura y valores de pH entre 7,0 y 7,8.

De las gráficas de contorno se deduce que el proceso es más sensible a los cambios de E_o/S_o y E_o/S_o' que a los de pH o temperatura.

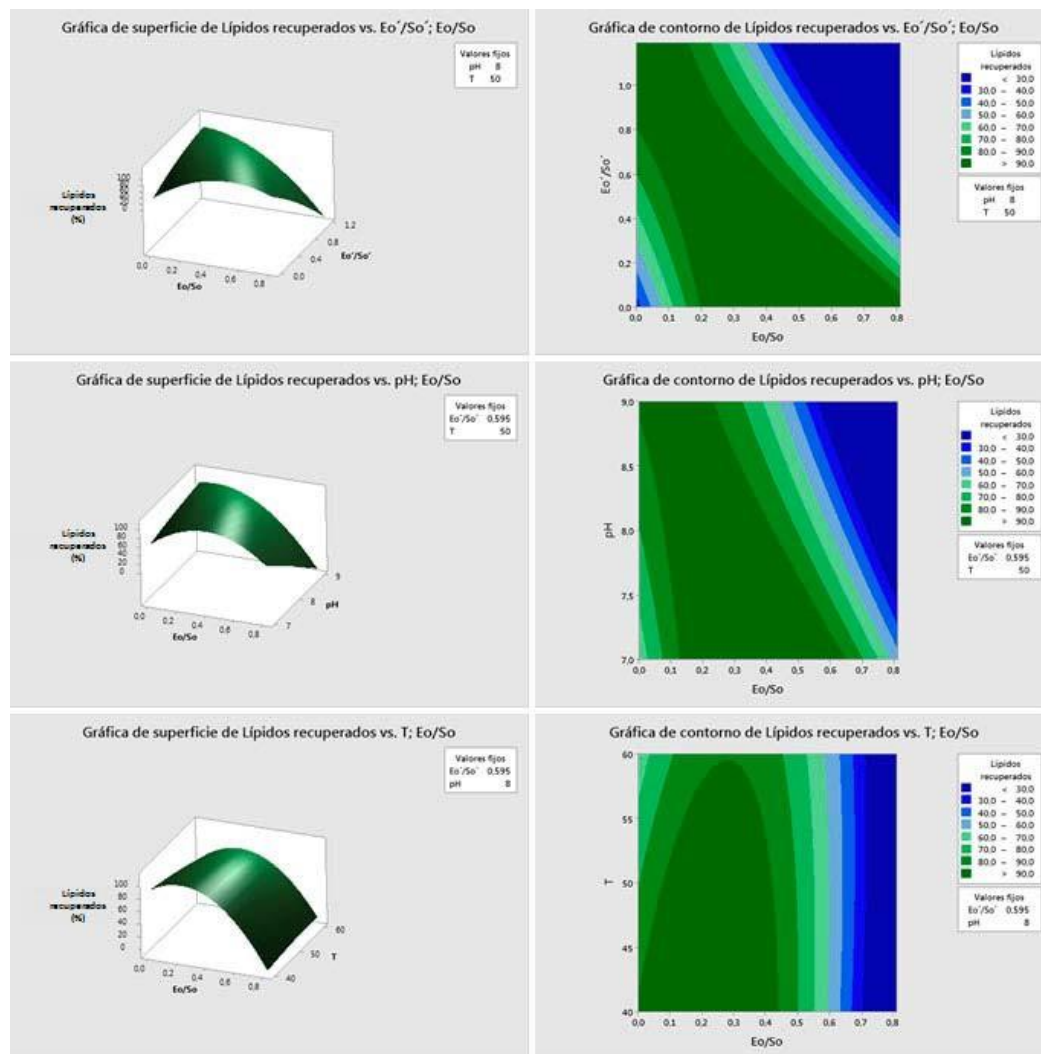


Figura 5.117. Gráficas de superficie de respuesta y de contorno para el porcentaje de lípidos recuperados mostrando los efectos de la interacción de E_o/S_o - E_o/S_o' , E_o/S_o -pH y E_o/S_o -T

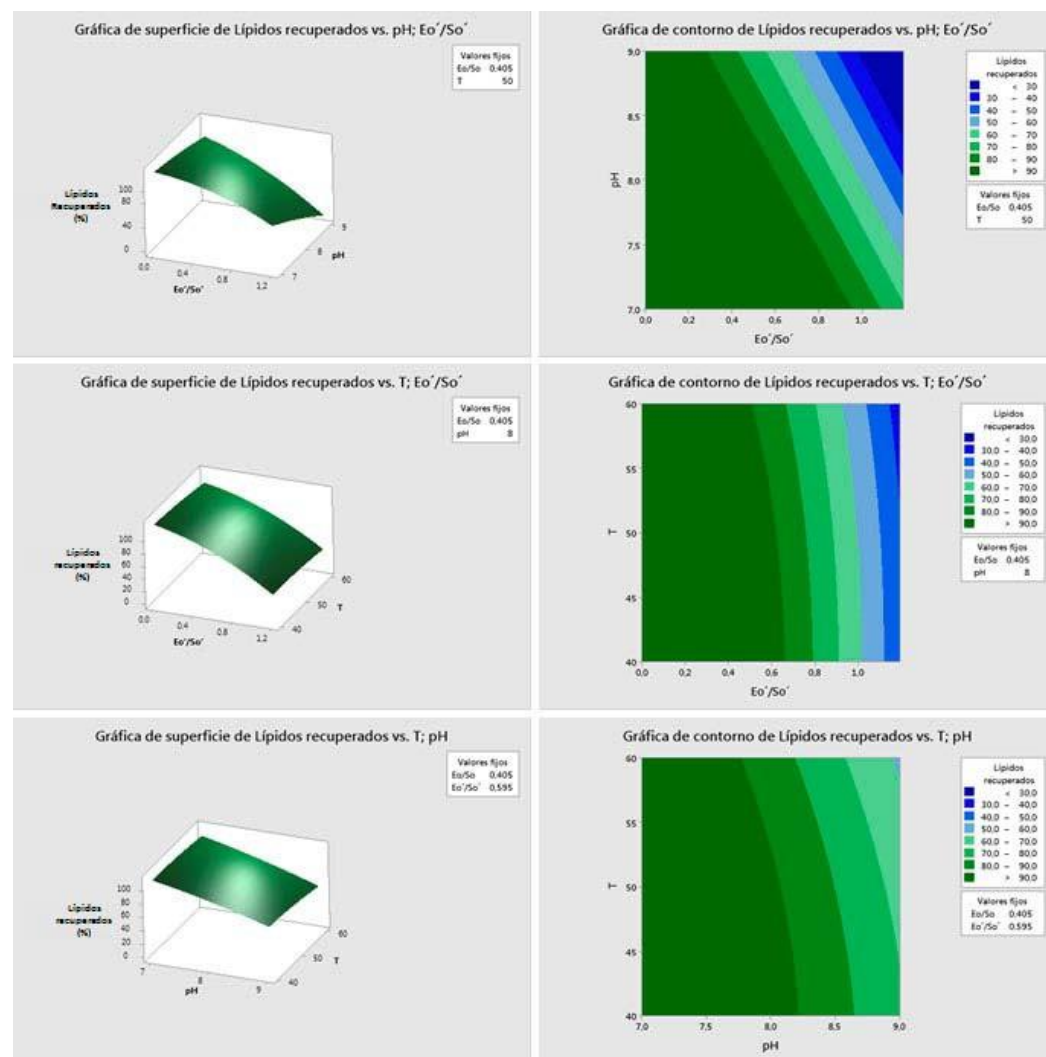


Figura 5.118. Gráficas de superficie de respuesta y de contorno para el porcentaje de lípidos recuperados mostrando los efectos de la interacción de Eo/So'-pH y Eo/So'-T y pH-T

A partir de los resultados de las gráficas de superficie y de contorno, se ha optimizado el proceso para la recuperación de lípidos lo mayor posible: el objetivo es conseguir un porcentaje de lípidos recuperados máximo, es decir, del 100 % (figura 119).

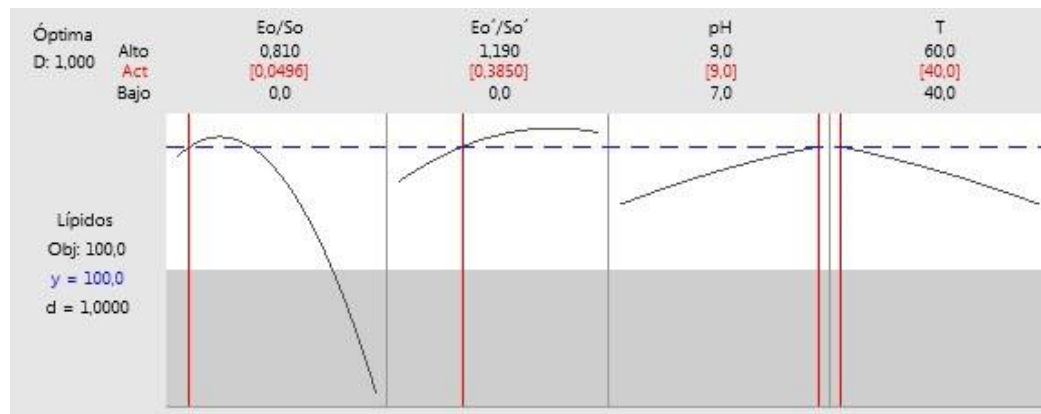


Figura 5.119. Gráficas de optimización de respuesta para el porcentaje de lípidos recuperados

Los resultados de la optimización de los parámetros estudiados se incluyen en la tabla 5.45.

Tabla 5.45.- Configuración de las variables de proceso para obtención del máximo porcentaje de lípidos recuperados

Factor	Valor óptimo
Eo/So (UA/g)	0,05
Eo'/So' (kLU/g)	0,38
pH	9,00
T (°C)	40

5.4.3.3. Colágeno no hidrolizado

El ajuste cuadrático con interacción de variables para el colágeno no hidrolizado dio la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Porcentaje de colágeno no hidrolizado} = & -562,00 - 356,00 \cdot Eo/So + 20,30 \cdot Eo'/So' \\ & + 83,30 \cdot pH + 12,69 \cdot T + 248,80 \cdot Eo/So \cdot Eo/So - 22,87 \cdot Eo'/So' \cdot Eo'/So' - 1,64 \cdot pH \cdot pH - \\ & 0,02 \cdot T \cdot T - 33,60 \cdot Eo/So \cdot Eo'/So' + 4,60 \cdot Eo/So \cdot pH + 1,03 \cdot Eo/So \cdot T + 5,46 \cdot Eo'/So' \cdot pH - \\ & 0,56 \cdot Eo'/So' \cdot T - 1,24 \cdot pH \cdot T \end{aligned}$$

Ec. 5.64

Los resultados obtenidos a partir del análisis de varianza para el modelo experimental empleado se muestran en la tabla 5.46.

Tabla 5.46.- Análisis de varianza para el porcentaje de lípidos recuperados

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor p
Modelo	14	24762,7	1768,77	254,72	0,000
Lineal	4	3011,3	752,83	108,42	0,000
Eo/So	1	639,3	639,28	92,06	0,000
Eo'/So'	1	6,3	6,35	0,91	0,347
pH	1	0,0	0,00	0,00	0,980
T	1	7,1	7,10	1,02	0,320
Cuadrado	4	2311,8	577,95	83,23	0,000
Eo/So·Eo/So	1	1200,4	1200,36	172,87	0,000
Eo'/So'·Eo'/So'	1	212,5	212,51	30,60	0,000
pH·pH	1	9,1	9,14	1,32	0,261
T·T	1	18,0	17,96	2,59	0,119
Interacción de 2 factores	6	141,2	23,54	3,39	0,012
Eo/So·Eo'/So'	1	25,5	25,54	3,68	0,065
Eo/So·pH	1	0,5	0,48	0,07	0,794
Eo/So·T	1	2,6	2,58	0,37	0,547
Eo'/So'·pH	1	19,1	19,06	2,74	0,109
Eo'/So'·T	1	22,0	21,96	3,16	0,086
pH·T	1	34,0	33,98	4,89	0,035
Error	28	194,4	6,94		
Falta de ajuste	24	194,4	8,10	949,20	0,000
Error puro	4	0,0	0,01		
Total	42	24957,2			

El elevado valor de F del modelo de 254,72 y la probabilidad de $0,00 < 0,05$ implica que el modelo es significativo, indicando que la ecuación del modelo describe adecuadamente la superficie de respuesta respecto al porcentaje de colágeno no hidrolizado en el intervalo de investigación.

Los términos del modelo significativos ($p < 0,05$) que tienen mayor efecto en la variable de respuesta son (figura 5.120) (Eo/So), (Eo/So·Eo/So), (Eo'/So'·Eo'/So'), (pH·T), siendo (Eo/So), (Eo/So·Eo/So) y (Eo/So·Eo'/So') (probabilidad=0,000) los términos que más influencia tienen en la recuperación de colágeno no hidrolizado. Los valores p superiores a 0,05 indican los términos e interacciones de modelo no significativos, es decir, que no influyen en el rendimiento del proceso.

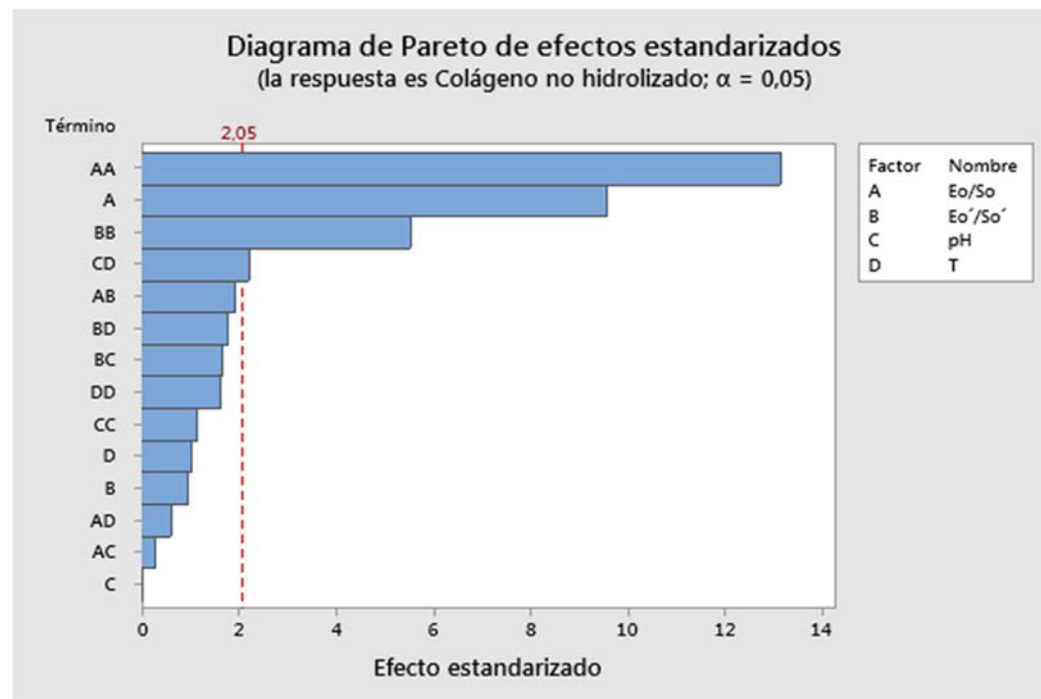


Figura 5.120. Diagrama de Pareto para el porcentaje de colágeno no hidrolizado

Para comprobar la validez del ajuste se han representado los valores del porcentaje de colágeno no hidrolizado calculados a partir de la ecuación frente a los observados experimentalmente (figura 5.121).

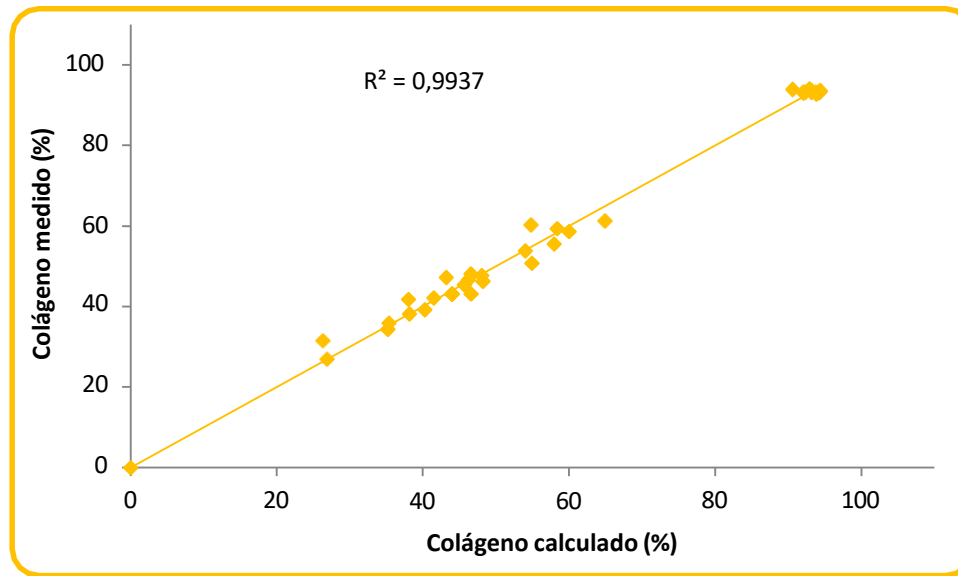


Figura 5.121. Representación del porcentaje de colágeno no hidrolizado calculado frente al obtenido experimentalmente

La calidad del ajuste del modelo, expresada por el coeficiente de determinación R^2 , es de 0,9937; este resultado señala que el modelo es conveniente para describir la variable de respuesta representando adecuadamente la correlación entre las variables en estudio. Señala además que el 99,4 % de la variabilidad fue explicada por este modelo y que solo el 0,6 % no lo es o es un resultado de la casualidad.

Se puede optimizar el valor de la superficie de respuesta a partir de la ecuación que liga el porcentaje de colágeno no hidrolizado con las variables de proceso. Las figuras 5.122 y 5.123 incluyen las gráficas de superficie de respuesta y de contorno de los parámetros estudiados combinados de dos en dos. De nuevo se ha optado por fijar en cada caso los parámetros no analizados en un valor medio ($E_o/S_o = 0,405$ UA/g, $E_o'/S_o' = 0,595$ kLU/g, $pH = 8,0$ y $T = 50^\circ C$). En las gráficas se puede observar que la superficie donde se alcanzan valores máximos en el porcentaje de colágeno no hidrolizado:

- Para $\text{pH} = 8,0$ y $T = 50^\circ\text{C}$ corresponde a valores de E_o/S_o de 0,00 o muy próximos a ese valor mientras que, como cabía esperar, los valores de E_o'/S_o' no influyen en el porcentaje de colágeno no hidrolizado. De la gráfica de contorno se deduce que el proceso es solo sensible a los cambios de E_o/S_o .
- Para $E_o'/S_o' = 0,595 \text{ kLU/g}$ y $T = 50^\circ\text{C}$ corresponde a valores de E_o/S_o de 0,00 o muy próximos a ese valor mientras que los valores de pH no influyen en el porcentaje de colágeno no hidrolizado. De la gráfica de contorno se deduce que el proceso es solo sensible a los cambios de E_o/S_o .
- Para $E_o'/S_o' = 0,595 \text{ kLU/g}$ y $\text{pH} = 8,0$ corresponde a valores de E_o/S_o de 0,00 o muy próximos a ese valor mientras que los valores de temperatura no influyen en el porcentaje de colágeno no hidrolizado. De la gráfica de contorno se deduce que el proceso es solo sensible a los cambios de E_o/S_o .
- Para $E_o/S_o = 0,405 \text{ UA/g}$ y $T = 50^\circ\text{C}$ corresponde a valores de pH entre 7,1 y 8,5 y valores de E_o'/S_o' de a 0,30 a 0,70 kLU/g .
- Para $E_o/S_o = 0,405 \text{ UA/g}$ y $\text{pH} = 8,0$ corresponde a temperaturas de 55°C o superiores y valores de E_o'/S_o' entre 0,20 y 0,70 kLU/g .
- Para $E_o/S_o = 0,405 \text{ UA/g}$ y $E_o'/S_o' = 0,595 \text{ kLU/g}$ corresponde a una temperatura de 60°C y a un $\text{pH} 7,0$.

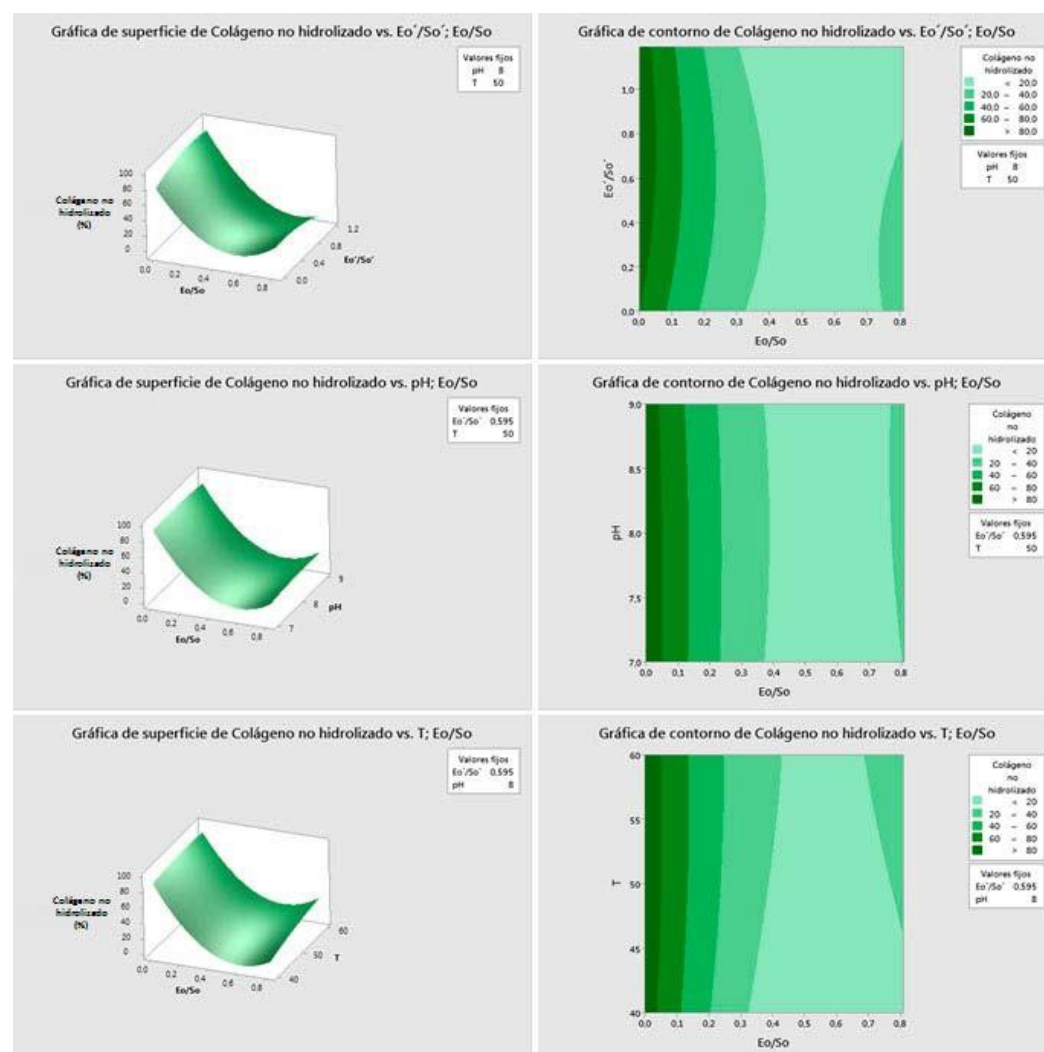


Figura 5.122. Gráficas de superficie de respuesta y de contorno para el porcentaje de colágeno no hidrolizado mostrando los efectos de la interacción de Eo/So-Eo'/So', Eo/So-pH y Eo/So-T

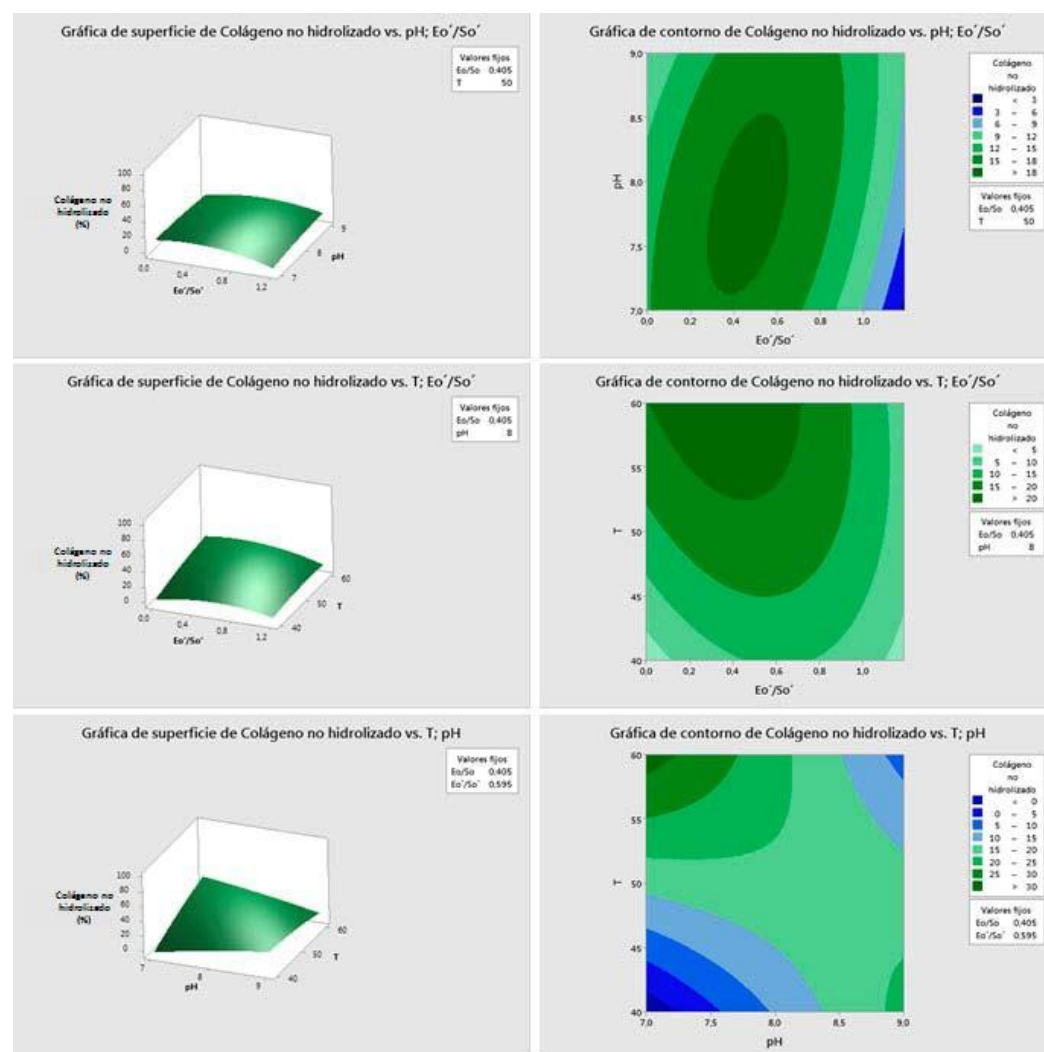


Figura 5.123. Gráficas de superficie de respuesta y de contorno para el porcentaje de colágeno no hidrolizado mostrando los efectos de la interacción de Eo/So'-pH y Eo'/So'-T y pH-T

En función de los resultados de las gráficas de superficie y de contorno, se ha optimizado el proceso para una recuperación de colágeno no hidrolizado lo más elevada posible: el objetivo es conseguir un porcentaje de colágeno no hidrolizado máximo, es decir, del 100 % (figura 124).

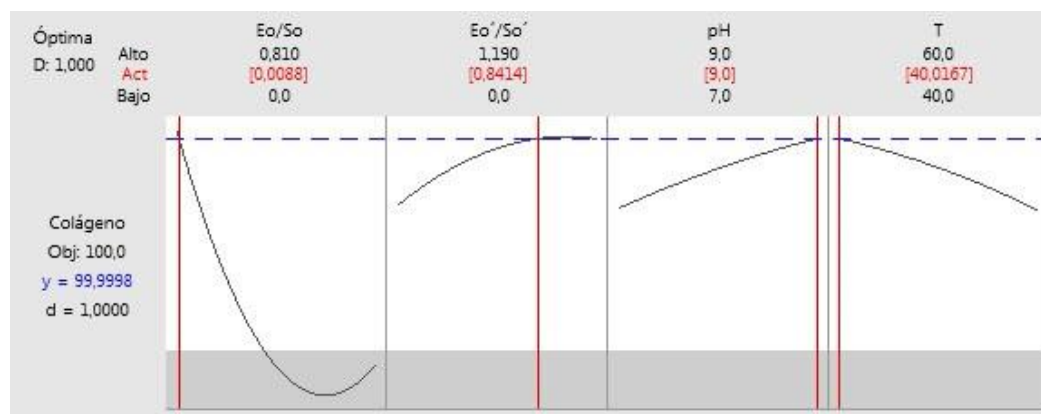


Figura 5.124. Gráficas de optimización de respuesta para porcentaje de colágeno no hidrolizado

En la tabla 5.47 se resumen los resultados de la optimización de los parámetros estudiados.

Tabla 5.47.- Configuración de las variables de proceso para obtención del máximo porcentaje de colágeno no hidrolizado

Factor	Valor óptimo
Eo/So (UA/g)	0,01
Eo'/So' (kLU/g)	0,84
pH	9,00
T (°C)	40

5.4.3.4. Residuo no solubilizado

La ecuación del ajuste cuadrático con interacción de variables para el residuo no solubilizado resultó ser la siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Porcentaje de residuo no solubilizado} = & -436,00 - 612,00 \cdot Eo/So - 105,30 Eo'/So' \\ & + 60,00 \cdot pH + 11,32 \cdot T + 226,70 \cdot Eo/So \cdot Eo/So + 17,12 \cdot Eo'/So' \cdot Eo'/So' - 1,97 \cdot pH \cdot pH - \\ & 0,03 \cdot T \cdot T + 152,10 \cdot Eo/So \cdot Eo'/So' + 59,70 \cdot Eo/So \cdot pH - 2,28 \cdot Eo/So \cdot T + 8,52 \cdot Eo'/So' \cdot pH \\ & - 0,37 \cdot Eo'/So' \cdot T - 0,87 \cdot pH \cdot T \end{aligned}$$

Ec. 5.65

El análisis de varianza para el modelo experimental empleado dio los resultados que se muestran en la tabla 5.48.

Tabla 5.48.- Análisis de varianza para el porcentaje de residuo no solubilizado

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Valor p
Modelo	14	3914,43	279,602	57,52	0,000
Lineal	4	337,65	84,413	17,37	0,000
Eo/So	1	54,73	54,734	11,26	0,002
Eo'/So'	1	176,28	176,283	36,27	0,000
pH	1	44,47	44,474	9,15	0,005
T	1	0,09	0,085	0,02	0,896
Cuadrado	4	1133,11	283,276	58,28	0,000
Eo/So·Eo/So	1	996,11	996,114	204,92	0,000
Eo'/So'·Eo'/So'	1	119,01	119,012	24,48	0,000
pH·pH	1	13,09	13,092	2,69	0,112
T·T	1	36,94	36,943	7,60	0,010
Interacción de 2 factores	6	676,49	112,749	23,19	0,000
Eo/So·Eo'/So'	1	522,00	522,002	107,39	0,000
Eo/So·pH	1	80,39	80,388	16,54	0,000
Eo/So·T	1	12,75	12,750	2,62	0,117
Eo'/So'·pH	1	46,50	46,500	9,57	0,004
Eo'/So'·T	1	9,23	9,229	1,90	0,179
pH·T	1	16,64	16,645	3,42	0,075
Error	28	136,11	4,861		
Falta de ajuste	24	136,11	5,671		
Error puro	4	0,00	0,000		
Total	42	4050,54			

El valor de F del modelo de 57,52 y la probabilidad de $0,00 < 0,05$ implica que el modelo es significativo, lo que indica que la ecuación del modelo describe adecuadamente la superficie de respuesta con respecto al porcentaje de residuo no solubilizado, los factores y los niveles estudiados.

Los valores de probabilidad (valor p) inferiores a 0,05 indican que tanto los términos del modelo como sus interacciones son significativas. Para este caso los términos que tienen mayor efecto en la variable de respuesta son (figura 5.125) (Eo/So), (Eo'/So'), pH, (Eo/So·Eo/So), (Eo'/So'·Eo'/So'), (T·T), (Eo/So·Eo'/So'), (Eo/So·pH), (Eo'/So'·pH), siendo (Eo/So·Eo/So), (Eo'/So'·Eo'/So'), (Eo/So·Eo'/So') y (Eo/So·pH) (probabilidad=0,000) los términos que más influencia tienen en el porcentaje de residuo no solubilizado. Los valores p superiores a 0,05 indican los factores del modelo que no son significativos o cuya interacción no influye en el rendimiento del proceso.

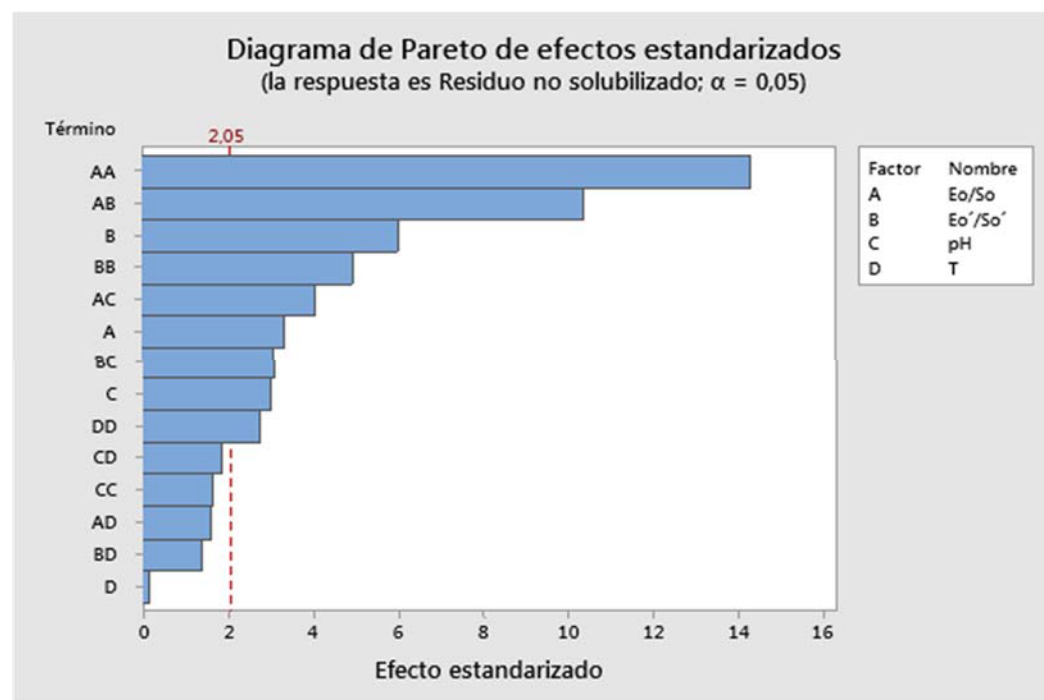


Figura 5.125. Diagrama de Pareto para el porcentaje de residuo no solubilizado

La representación del porcentaje de residuo no solubilizado calculado a partir de la ecuación frente al observado experimentalmente (figura 5.126) permite determinar también la bondad del modelo.

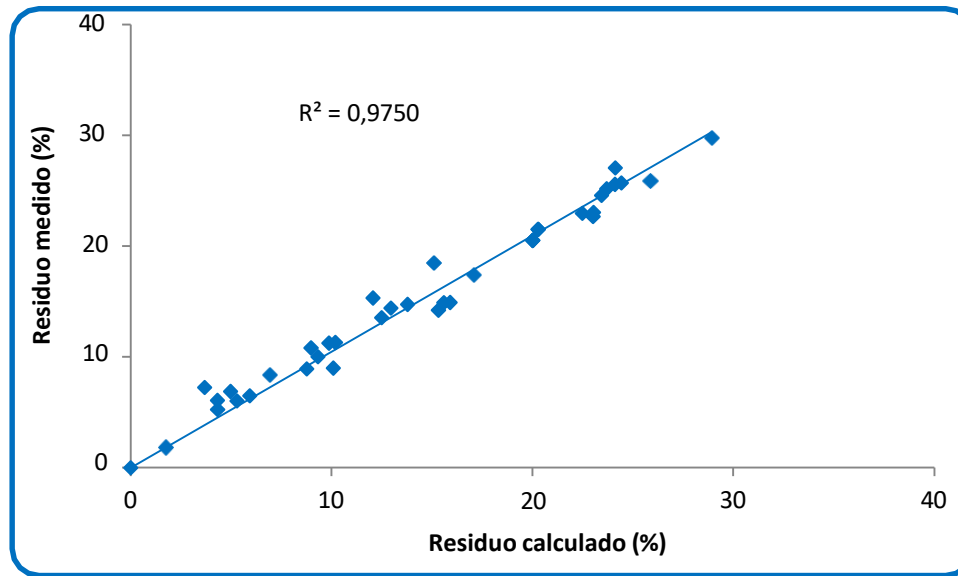


Figura 5.126. Representación del porcentaje de residuo no solubilizado calculado frente al obtenido experimentalmente

El coeficiente de determinación R^2 , cuyo valor es 0,9750, es indicativo de la calidad del ajuste del modelo, señala que el modelo es conveniente para describir la variable de respuesta representando adecuadamente la correlación entre las variables en estudio. Señala además que el 97,5 % de la variabilidad fue explicada por este modelo y que solo el 2,5 % no lo es o es un resultado de la casualidad.

Se ha realizado la optimización del valor de la superficie de respuesta a partir de la ecuación que liga el porcentaje de residuo no solubilizado con las variables de proceso. Esta optimización aparece representada en las figuras 5.127 y 5.128 mediante las gráficas de superficie de respuesta y de contorno de los parámetros estudiados combinados de dos en dos. Como en los casos anteriores se ha optado por fijar en cada caso los parámetros no analizados en un valor medio ($E_o/S_o = 0,405$ UA/g, $E_o'/S_o' = 0,595$ kLU/g, pH = 8,0 y T = 50°C). Respecto al porcentaje de residuo no solubilizado interesa que quede la menor cantidad posible del mismo lo que implica la mayor obtención posible de productos con alto valor añadido; por ello en esas gráficas se puede apreciar que la superficie donde se alcanzan valores mínimos en el porcentaje de residuo no solubilizado:

- Para $\text{pH} = 8,0$ y $T = 50^{\circ}\text{C}$ se encuentra en un amplio margen de combinación de valores de $\text{Eo/So-Eo}'/\text{So}'$: así, fijando Eo/So en $0,25 \text{ UA/g}$, se obtienen mínimas cantidades de sólido no solubilizado independientemente de los valores de Eo'/So' y, fijando Eo'/So' en valores inferiores a $0,10 \text{ kLU/g}$ se obtienen mínimas cantidades de sólido no solubilizado para valores de Eo/So superiores a $0,25 \text{ UA/g}$.
- Para $\text{Eo}'/\text{So}' = 0,595 \text{ kLU/g}$ y $T = 50^{\circ}\text{C}$ también se encuentra en un amplio margen de combinación de valores de Eo/So-pH : así, fijando Eo/So entre $0,15$ y $0,40 \text{ UA/g}$, se obtienen mínimas cantidades de sólido no solubilizado independientemente de los valores del pH y, fijando el pH en valores próximos a $7,0$ se obtienen mínimas cantidades de sólido no solubilizado para valores de Eo/So superiores a $0,15 \text{ UA/g}$.
- Para $\text{Eo}'/\text{So}' = 0,595 \text{ kLU/g}$ y $\text{pH} = 8,0$ corresponde a valores de Eo/So entre $0,18$ y $0,55 \text{ UA/g}$, mientras que los valores de temperatura no influyen en el porcentaje de residuo no solubilizado. De la gráfica de contorno se deduce que el proceso es solo sensible a los cambios de Eo/So .
- Para $\text{Eo/So} = 0,405 \text{ UA/g}$ y $T = 50^{\circ}\text{C}$ también se encuentra en un amplio margen de combinación de valores de $\text{Eo}'/\text{So}'\text{-pH}$: así, para valores de Eo'/So' inferiores a $0,50 \text{ UA/g}$, se obtienen mínimas cantidades de sólido no solubilizado independientemente de los valores del pH y, fijando el pH en valores inferiores a $7,4$ se obtienen mínimas cantidades de sólido no solubilizado independientemente de los valores de Eo'/So' .
- Para $\text{Eo/So} = 0,405 \text{ UA/g}$ y $\text{pH} = 8,0$ se encuentra para temperaturas entre 40 y 60°C y valores de Eo'/So' inferiores a $0,90 \text{ kLU/g}$.
- Para $\text{Eo/So} = 0,405 \text{ UA/g}$ y $\text{Eo}'/\text{So}' = 0,595 \text{ kLU/g}$ corresponde a una temperatura inferior a 53°C y a un pH entre $7,0$ y $8,5$ o a una temperatura superior a 53°C y a un pH entre $8,5$ y $9,0$.

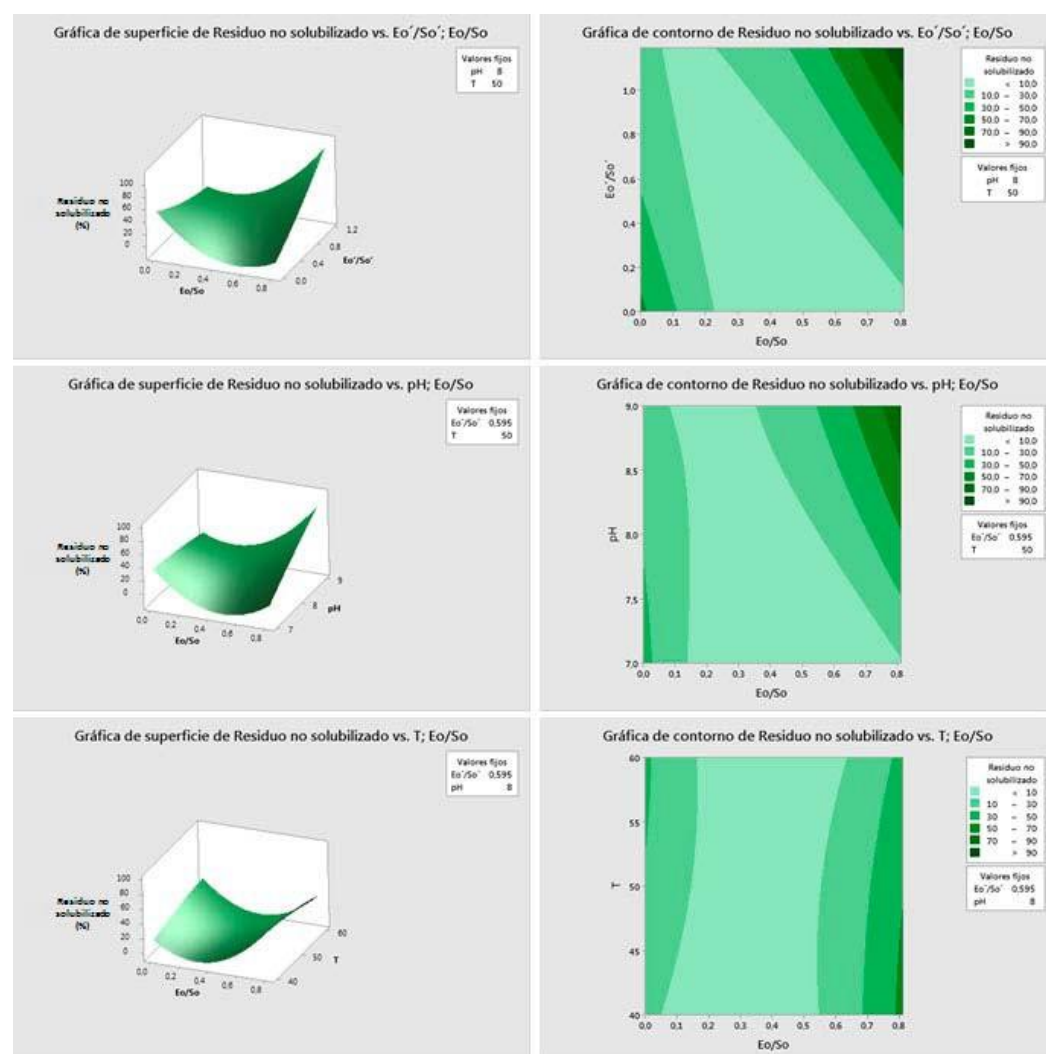


Figura 5.127. Gráficas de superficie de respuesta y de contorno para el porcentaje de residuo no solubilizado mostrando los efectos de la interacción de E_o/So - E_o'/So' , E_o/So -pH y E_o/So -T

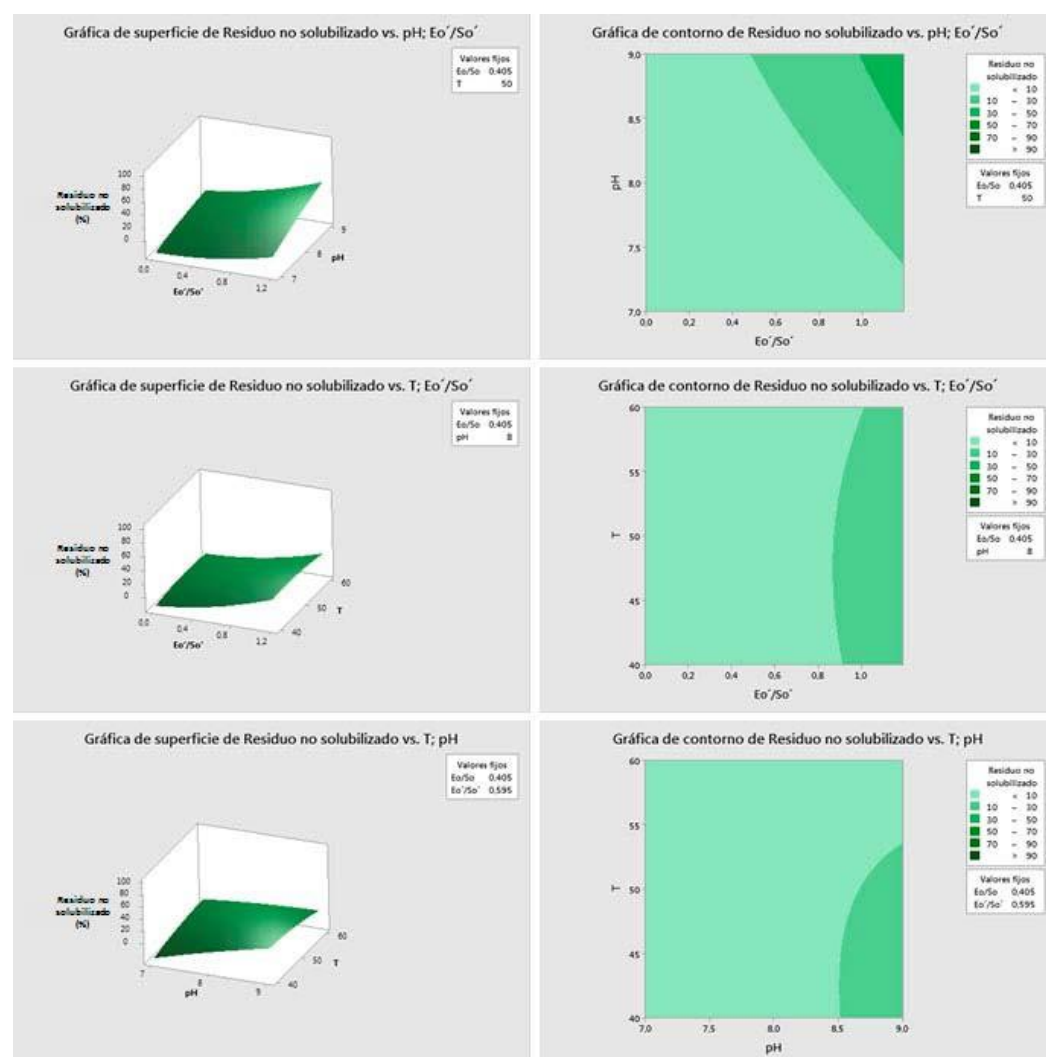


Figura 5.128. Gráficas de superficie de respuesta y de contorno para el porcentaje de residuo no solubilizado mostrando los efectos de la interacción de Eo/So' -pH y Eo/So' -T y pH-T

Se ha optimizado, a partir de los resultados de las gráficas de superficie y de contorno, el proceso para obtener un porcentaje de residuo no solubilizado lo más bajo posible: el objetivo es conseguir un porcentaje de residuo no solubilizado mínimo, es decir, del 0 % (figura 129).

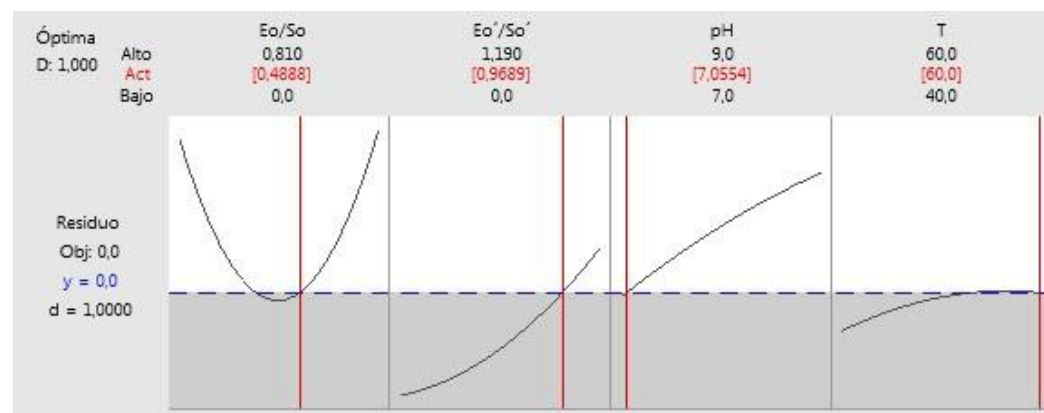


Figura 5.129. Gráficas de optimización de respuesta para porcentaje de residuo no solubilizado

Los resultados de la optimización de los parámetros estudiados se han incluido en la tabla 5.49.

Tabla 5.49.- Configuración de las variables de proceso para obtención del máximo porcentaje de colágeno no hidrolizado

Factor	Valor óptimo
Eo/So (UA/g)	0,49
Eo'/So' (kLU/g)	0,97
pH	7,05
T (°C)	60

5.5. Evaluación económica del tratamiento

Con la finalidad de comprobar si el aprovechamiento integral de los residuos de carnicerías es viable económicamente, se ha analizado la rentabilidad económica del proceso.

En primer lugar, se ha evaluado económicamente el proceso en función de la enzima utilizada; para ello se ha procedido a analizar el coste de las enzimas por unidad de actividad de acuerdo con la información facilitada por el suministrador para cantidades industriales (tablas 5.50 y 5.51).

Tabla 5.50.- Coste de las proteasas ensayadas

Proteasa	Actividad (UA/g)	Coste (€/kg)	Coste*10² (€/UA)
Alcalase 2.4L	2,4	35	1,46
Neutrased 0.8L	0,8	21	2,63
Protamex	1,5	60	4,00
Flavourzyme 1000L	0,8	70	8,75
PTN	6	774	12,90

Tabla 5.51.- Coste de las lipasas ensayadas

Lipasa	Actividad (kLU/g)	Coste (€/kg)	Coste*10³ (€/kLU)
Lipozyme TL 100L	100	55	0,55
Resinase HT	50	35	0,70
Novozym 51032	15	35	2,33
Novocor AD L	6	21	3,50
Lipozyme CALB L	5	83	16,60

Si bien, para una misma cantidad de enzima, Neutrased y Novocor AD L resultan ser las enzimas más económicas (21 €/kg) no ocurre lo mismo cuando se hace el análisis en función de su actividad que es el parámetro que se utilizó para hacer el estudio comparativo: una misma actividad inicial de enzima en el reactor. En ese caso, Alcalase ($1,46 \cdot 10^{-2}$ €/UA) y Lipozyme TL 100L ($0,55 \cdot 10^{-3}$ €/kLU) resultan más económicas.

Esto podría sugerir que es más adecuado utilizar Lipozyme TL 100L en lugar de Resinase, sin embargo, el menor grado de hidrólisis de los lípidos alcanzado al utilizar esa enzima (GH' alcanzado con Lipozyme TL = 29,18 %) obligaría a aumentar la cantidad de la misma a añadir al reactor para conseguir mayor actividad y, de ese modo, alcanzar el mismo grado de hidrólisis obtenido con Resinase (GH' = 90,46 %). En el caso de Lipozyme TL 100L, para obtener el mismo grado de hidrólisis de lípidos que con Resinase, el coste sería de 1,71 en lugar de 0,55 €.

Una vez comprobado que las enzimas seleccionadas (Alcalase 2.4L y resinase HT) eran las más adecuadas no solo por el grado de hidrólisis alcanzado sino también por su menor coste, se ha procedido a determinar el coste de tratamiento de un kilogramo de residuo cárnico y los ingresos generados por la venta de los subproductos obtenidos a partir de él con la finalidad de calcular los posibles beneficios a obtener.

5.5.1. Costes de tratamiento

Los costes de tratamiento (C_T) se pueden dividir en costes de la etapa de reacción (C_{ER}) y costes de la etapa de separación y purificación de productos (C_{ES}):

$$C_T = C_{ER} + C_{ES} \quad \text{Ec. 5.66}$$

No se han incluido los costes de pretratamiento correspondientes a la etapa de molienda y tamizado del residuo antes de su utilización en el reactor porque son despreciables.

5.5.1.1. Costes de etapa de reacción

El coste de la etapa de reacción (C_{ER}) se ha calculado a partir de la suma del coste de los reactivos y los catalizadores (C_R) y del coste calorífico (C_C) que implica la hidrólisis:

$$C_{ER} = C_R + C_e \quad \text{Ec. 5.67}$$

5.5.1.1.1. Coste de reactivos y catalizadores

A parte del residuo y el agua necesaria para llevar a cabo la hidrólisis, es necesario añadir enzimas para que la reacción se desarrolle e hidróxido de sodio para controlar el pH, tal y como ya se ha explicado en las secciones anteriores. El coste del hidróxido de sodio y del agua es despreciable frente al de la enzima por lo que el coste de la partida de reactivos y catalizadores (C_R) se puede expresar de la siguiente forma:

$$C_R = a_p p_p + a l p \quad \text{Ec. 5.68}$$

donde a_p es la actividad de la proteasa empleada en el tratamiento, p_p es el precio por unidad de actividad de proteasa, a_l es la actividad de la lipasa empleada en el tratamiento, p_l es el precio por unidad de actividad de lipasa.

La actividad de las enzimas puede determinarse a partir de las siguientes ecuaciones:

$$a_p = E_o V \quad \text{Ec. 5.69}$$

$$a_l = E_o' V \quad \text{Ec. 5.70}$$

en las que E_o es la concentración inicial de Alcalase en UA/l, E_o' es la concentración inicial de Resinase en kLU/l y V es el volumen de mezcla en el reactor.

El volumen de mezcla en el reactor (V) se obtiene como el cociente entre la cantidad de sustrato a tratar (1 kg o 1000 g de residuos cárnicos) y la concentración inicial de residuo cárnico añadida en cada experimento. Para los experimentos con Alcalase y Resinase conjuntamente, que son los que se van a utilizar en este estudio y en los que se trabajó con 166,67 g/l de residuo cárnico en el reactor, el volumen de mezcla en el reactor resultaría ser 6,00 l.

De acuerdo con las ecuaciones anteriores, es obvio que el coste de esta partida, además de depender de la concentración inicial de residuo cárnico en el reactor, también depende de la concentración inicial de enzima empleada (tabla 5.52).

Tabla 5.52.- Coste de reactivos

Experimento	Eo/So (UA/l)	Eo'/So' (kLU/l)	Eo (UA/l)	Eo' (kLU/l)	a_P (UA)	a_L (kLU)	C_R (€/kg de residuo)
1	0,11	0,55	1,87	34,95	11,22	209,70	0,311
2	0,11	0,83	1,87	52,44	11,22	314,63	0,384
3	0,11	1,11	1,87	69,89	11,22	419,33	0,457
4	0,16	0,55	2,81	34,95	16,86	209,70	0,393
5	0,16	0,83	2,81	52,44	16,86	314,63	0,466
6	0,16	1,11	2,81	69,89	16,86	419,33	0,540
7	0,21	0,55	3,74	34,95	22,44	209,70	0,474
8	0,21	0,83	3,74	52,44	22,44	314,63	0,548
9	0,21	1,11	3,74	69,89	22,44	419,33	0,621

Como puede apreciarse en la tabla 5.52, el coste de la operación se ve favorecido por la utilización de relaciones Eo/So y Eo'/So' bajas, lo que corresponde a concentraciones iniciales bajas de enzima y altas de sustrato.

5.5.1.1.2. Coste calorífico

Dado que el proceso se lleva a cabo a temperaturas superiores a la temperatura ambiente, la partida del coste calorífico incluye el coste de calentar el agua hasta la temperatura de reacción y de mantener esa temperatura durante el tiempo de duración de la hidrólisis.

Como combustible se propone utilizar gas natural con un poder calorífico inferior de 47,087 kJ/kg y un precio de 0,676 €/kg. El consumo de gas se calcula por el cociente entre el calor necesario para el proceso (Q) y el poder calorífico de dicho gas (PCI). El coste calorífico de cada tratamiento será el producto del consumo por el precio en el mercado de dicho gas (p_C). De acuerdo con esto, la partida del coste calorífico (C_C) se puede expresar como:

$$C_e = \frac{Q}{P_{el}} p_e \quad \text{Ec. 5.71}$$

De acuerdo con lo indicado anteriormente, el calor implicado en cada tratamiento (Q) se divide en dos términos: el correspondiente al calentamiento de la mezcla reaccionante (Q_c) y el correspondiente al mantenimiento de la temperatura durante el tiempo de reacción (Q_m):

$$Q = Q_e + Q_m \quad \text{Ec. 5.72}$$

- *Calor correspondiente al calentamiento de la mezcla reaccionante (Q_c)*

Este término se puede estimar mediante la siguiente expresión:

$$Q_e = m_c \cdot c_p \cdot (T - T_o) \quad \text{Ec. 5.73}$$

donde m_c es la masa a calentar, c_p es la capacidad calorífica de la masa a calentar, T es la temperatura de reacción y T_o es la temperatura de entrada de la mezcla reaccionante (20°C).

Para determinar la masa a calentar se multiplica el volumen de mezcla en el reactor por la densidad de la misma que, para las condiciones de operación ensayadas, es de 1,03 g/ml; la cantidad de masa así obtenida es de 6,18 kg. Debido a que la concentración de trabajo es relativamente baja, se ha asimilado la capacidad calorífica de la mezcla a la del agua: 4186 kJ/kg °C (Lide, 2005).

- *Calor correspondiente al mantenimiento de la temperatura (Q_m)*

Este calor se calcula como la suma del calor que se perdería si el reactor no estuviese encamisado y se le suministrase calor desde el exterior (Q_p) y el calor de reacción (Q_R):

$$Q_m = Q_p + Q_R \quad \text{Ec. 5.74}$$

a) Pérdidas de calor (Q_p)

Las pérdidas de calor se pueden estimar a partir del coeficiente global de transmisión de calor (U), el área de transferencia de calor (A_t), el tiempo de reacción (t), la temperatura de reacción (T) y la temperatura ambiente (T_{amb}) de acuerdo con la siguiente expresión (Perry, 2019):

$$Q_p = U A_t t (T - T_{amb}) \quad \text{Ec. 5.75}$$

En los cálculos se ha considerado un valor medio de 20°C para la temperatura ambiente y un valor de 10,2 W/m² °C para el coeficiente de transmisión de calor que es valor típico dado en la bibliografía para tanques similares al utilizado en los experimentos (Perry, 2019). El tiempo de reacción se ha fijado en los 240 minutos de duración de los experimentos.

El área de transmisión de calor se ha determinado a partir del volumen necesario para tratar 1 kg de residuos de carnicería considerando que la reacción se lleva a cabo en un reactor cilíndrico ocupado en un 75 % por la mezcla reaccionante y cuyo diámetro es igual a la altura del líquido (Walas, 1990). De acuerdo con eso, el área lateral de transmisión de calor vendrá dada por:

$$A_t = \frac{16}{3} \frac{V}{(V_{rr})^{1/3}} \quad \text{Ec. 5.76}$$

El valor obtenido para el área de transmisión de calor ha resultado ser de 0,162 m².

b) Calor de reacción (Q_R)

El calor de reacción se divide en dos partes: el calor de la reacción de hidrólisis de proteínas (Q_{R1}) y el calor de la reacción de hidrólisis de lípidos (Q_{R2}):

$$Q_R = Q_{R1} + Q_{R2} \quad \text{Ec. 5.77}$$

Los calores de las reacciones de hidrólisis de proteínas y lípidos se pueden expresar en función del grado de hidrólisis del siguiente modo:

$$Q_{R1} = L\Delta H_{R1} S_o x h_T V \quad \text{Ec. 5.78}$$

$$Q_{R2} = L\Delta H_{R2} S_o' x' \frac{l}{P_{AG}} V \quad \text{Ec. 5.79}$$

donde:

ΔH_{R1} = Entalpia de reacción para la hidrólisis de los enlaces peptídicos.

ΔH_{R2} = Entalpia de reacción para la hidrólisis de los enlaces lipídicos.

S_o = Concentración inicial de sustrato proteico.

S_o' = Concentración inicial de sustrato lipídico.

x = Grado de hidrólisis de proteínas en tanto por uno (GH/100).

x' = Grado de hidrólisis de lípidos en tanto por uno (GH'/100).

h_T = Enlaces peptídicos totales presentes inicialmente en el sustrato.

PM_{AG} = Masa molar media de ácidos grasos en los lípidos del residuo.

V = Volumen de mezcla en el reactor.

Las entalpias de reacción para la hidrólisis de los enlaces peptídicos (ΔH_{R1}) y para la hidrólisis de los enlaces lipídicos (ΔH_{R2}) tienen unos valores medios de $-7,6 \pm 2,0$ kJ/mol y $1,8 \pm 0,2$ kJ/mol, respectivamente (Rekharsky et al., 1987).

En el caso de las hidrólisis con mezclas de Alcalase y Resinase para las que se va a hacer este estudio económico, no se pudo determinar el grado de hidrólisis tal y como se comentó anteriormente. Sin embargo, dado que se ha comprobado que existe una relación directa entre el porcentaje de proteína solubilizada y el grado de hidrólisis de proteínas y entre el porcentaje de lípidos recuperados y el grado de hidrólisis de lípidos,

se ha establecido la ecuación de esas relaciones a partir de los datos obtenidos en los experimentos con Alcalase y Resinase por separado (figuras 5.130 y 5.131).

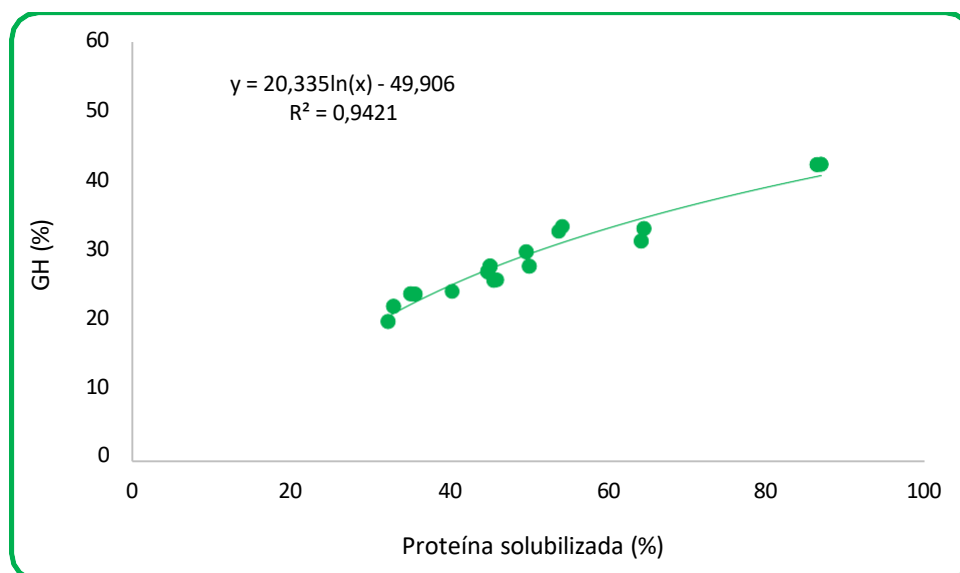


Figura 5.130. Relación entre el grado de hidrólisis de proteínas y el porcentaje de proteína solubilizada.

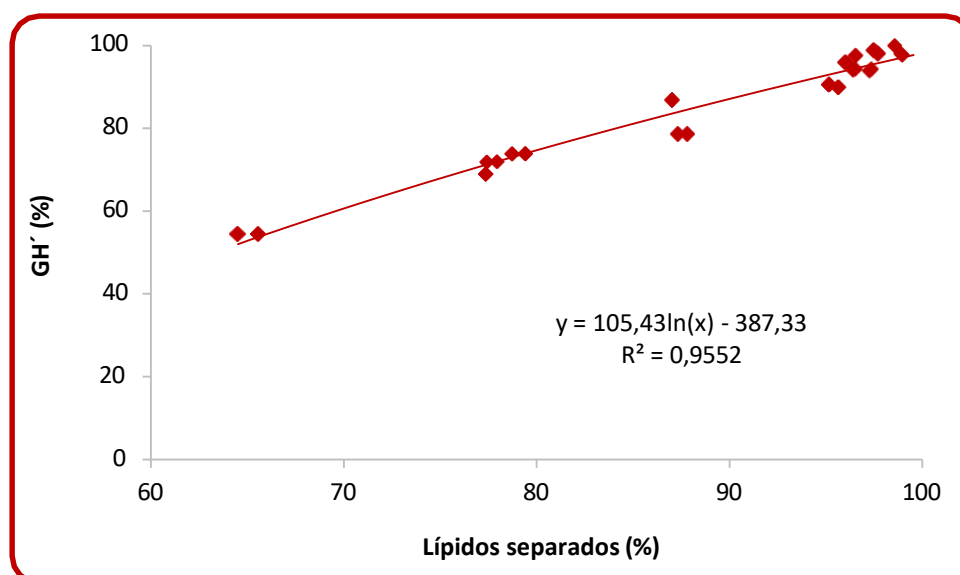


Figura 5.131. Relación entre el grado de hidrólisis de lípidos y el porcentaje de lípidos recuperados.

De acuerdo con los ajustes de las figuras 5.130 y 5.131 se han calculado los grados de hidrólisis a partir de las ecuaciones:

$$GH = 20,335 \cdot \ln(\text{Porcentaje de proteína solubilizada}) - 49,906 \quad \text{Ec. 5.80}$$

$$GH' = 105,43 \cdot \ln(\text{Porcentaje de lípidos recuperados}) - 387,33 \quad \text{Ec. 5.81}$$

Los valores del grado de hidrólisis del sustrato proteico (tabla 5.53) aseguran la calidad del hidrolizado obtenido al tener una masa molar media entre 350 y 500 Daltons calculada a partir de las ecuaciones 5.3 y 5.4.

Las concentraciones de sustrato proteico y de sustrato lipídico en los experimentos con mezclas de Alcalase y Resinase han sido 17,45 g/l y 63,24 g/l, respectivamente. Como se indicó en el estudio de hidrólisis de proteínas, el valor de los enlaces peptídicos totales presentes inicialmente en el sustrato es 7,6 mol/kg de proteína y, de acuerdo con la caracterización del residuo de carnicerías, el peso molecular de los ácidos grasos contenidos en él es de 279,73 Daltons. El volumen de mezcla en el reactor son los 6,0 l correspondientes al kg de residuo cárnico para el que se está haciendo el estudio económico.

En la tabla 5.53 se han incluido los distintos calores calculados implicados en el proceso y el coste calorífico y en la tabla 5.54 se muestran los costes totales de la etapa de reacción. De los resultados obtenidos se deduce que el coste de funcionamiento del reactor enzimático está principalmente condicionado por el coste de las enzimas, representando en torno al 95 % del coste total de la etapa de reacción en los experimentos estudiados.

Tabla 5.53.- Calores implicados en el proceso y coste calorífico

Experimento	T (°C)	GH (%)	GH' (%)	QR1 (kJ/kg residuo)	QR2 (kJ/kg residuo)	QR (kJ/kg residuo)	QP (kJ/kg residuo)	Qm (kJ/kg residuo)	Qc (kJ/kg residuo)	Q (kJ/kg residuo)	Cc (€/kg de residuo)
1	45	30,68	82,24	-1,86	2,00	0,15	596,61	596,76	646,42	1298,84	0,019
2	50	29,58	82,83	-1,79	2,02	0,23	715,94	716,17	775,70	1557,40	0,022
3	55	30,95	88,55	-1,87	2,16	0,29	835,26	835,55	904,98	1815,96	0,026
4	55	29,89	88,53	-1,81	2,16	0,35	835,26	835,61	904,98	1815,96	0,026
5	45	32,98	92,17	-1,99	2,25	0,25	596,61	596,86	646,42	1298,84	0,019
6	50	35,68	95,00	-2,16	2,32	0,16	715,94	716,10	775,70	1557,40	0,022
7	50	34,83	92,95	-2,11	2,27	0,16	715,94	716,10	775,70	1557,40	0,022
8	55	35,33	92,75	-2,14	2,26	0,12	835,26	835,38	904,98	1815,96	0,026
9	45	36,29	95,17	-2,19	2,32	0,13	596,61	596,74	646,42	1298,84	0,019

Tabla 5.54.- Costes de la etapa de reacción

Experimento	E_o (UA/l)	E_o' (kLU/l)	T (°C)	C_R (€/kg residuo)	C_c (€/kg de residuo)	C_{ER} (€/kg de residuo)
1	1,87	34,95	45	0,311	0,019	0,330
2	1,87	52,44	50	0,384	0,022	0,406
3	1,87	69,89	55	0,457	0,026	0,483
4	2,81	34,95	55	0,393	0,026	0,419
5	2,81	52,44	45	0,466	0,019	0,485
6	2,81	69,89	50	0,540	0,022	0,562
7	3,74	34,95	50	0,474	0,022	0,496
8	3,74	52,44	55	0,548	0,026	0,574
9	3,74	69,89	45	0,621	0,019	0,640

5.5.1.2. Costes de etapa de separación y purificación de productos

En la presente tesis no se ha llevado a cabo la separación y purificación de los productos individualmente por lo que no se pueden calcular los costes correspondientes. Sin embargo, sí que se pueden estimar ya que, según la bibliografía, los costes de separación y purificación de los productos de la corriente procedente de un biorreactor (downstream separation) representan entre el 60 y el 80 % de los costes de totales de producción (Wu et al., 2018; Brandt y Schembecker, 2016; Kiss et al., 2015; Shaeiwitz et al., 2000; Vallino y Stephanopoulos, 1990).

Teniendo esto en cuenta, la situación más conservadora en la que los costes de la etapa de separación y purificación sean un 80 % de los costes totales de producción o tratamiento del residuo y, por tanto, los costes de la etapa de reacción sean solo un 20 %, el valor de los primeros se puede calcular a partir de la siguiente expresión:

$$C_{ES} = \frac{80}{20} C_{ER} \quad \text{Ec. 5.82}$$

Los valores así calculados aparecen en la tabla 5.55.

5.5.1.3. Costes totales

Para obtener el valor de los costes totales de tratamiento se han sumado los costes de la etapa de reacción y los costes de la etapa de separación y purificación de productos de acuerdo con la ecuación 5.66, obteniéndose los valores que aparecen en la tabla 5.55. Estos valores indican que el coste de tratamiento oscila entre 1,65 y 3,20 € por kg de residuo de carnicería tratado en las condiciones de operación analizadas. Aunque *a priori* este resultado puede hacer pensar que el proceso no es adecuado, es necesario conocer los ingresos por venta de los productos obtenidos que se obtendrían para poder determinar si el proceso es rentable o no.

Tabla 5.55.- Costes de las etapas de reacción y separación y costes totales de tratamiento

Experimento	E_o/S_o (UA/g)	E_o/S_o' (kLU/g)	pH	T (°C)	C_{ER} (€/kg residuo)	C_{ES} (€/kg de residuo)	C_T (€/kg de residuo)
1	0,11	0,55	7.5	45	0,330	1,320	1,650
2	0,11	0,83	8.0	50	0,406	1,624	2,030
3	0,11	1,11	8.5	55	0,483	1,932	2,415
4	0,16	0,55	8.0	55	0,419	1,676	2,095
5	0,16	0,83	8.5	45	0,485	1,940	2,425
6	0,16	1,11	7.5	50	0,562	2,248	2,810
7	0,21	0,55	8.5	50	0,496	1,984	2,480
8	0,21	0,83	7.5	55	0,574	2,296	2,870
9	0,21	1,11	8.0	45	0,640	2,560	3,200

5.5.2. Ingresos por venta de productos

Los ingresos por venta de los productos se han calculado a partir de la cantidad de cada producto obtenido y el precio de venta del mismo dado por suministradores:

$$I_T = I_{hidrolizado\ proteico} + I_{colágeno\ no\ hidrolizado} + I_{ácidos\ grasos} \quad \text{Ec. 5.83}$$

$$I_{hidrolizado\ proteico} = m_{hidrolizado\ proteico} \cdot P_{hidrolizado\ proteico} \quad \text{Ec. 5.84}$$

$$I_{colágeno\ no\ hidrolizado} = m_{colágeno\ no\ hidrolizado} \cdot P_{colágeno\ no\ hidrolizado} \quad \text{Ec. 5.85}$$

$$I_{ácidos\ grasos\ libres} = \sum m_{ácido\ graso} \cdot P_{ácido\ graso} \quad \text{Ec. 5.86}$$

donde:

I_T: ingresos totales por ventas

I_{hidrolizado proteico}: Ingresos por venta del hidrolizado proteico

I_{colágeno no hidrolizado}: Ingresos por venta del colágeno no hidrolizado

I_{ácidos grasos}: Ingresos por venta de los ácidos grasos

m_{hidrolizado proteico}: Cantidad de hidrolizado proteico obtenido equivalente a la cantidad de proteína solubilizada

m_{colágeno no hidrolizado}: Cantidad de colágeno no hidrolizado obtenido

m_{ácido graso}: Cantidad de cada ácido graso obtenido

p_{hidrolizado proteico}: Precio del hidrolizado proteico

p_{colágeno no hidrolizado}: Precio del colágeno no hidrolizado

p_{ácido graso}: Precio de cada ácido graso

Para determinar el valor de los ingresos por venta de ácidos grasos se analizó la composición en ácidos grasos en la fase lipídica obtenida en los distintos experimentos calculando, a partir de los $mg_{ácido}/glípidos$ y los $glípidos$ obtenidos en los análisis (tablas IV.13 y IV.14 del Anexo IV) y de la relación entre el volumen de mezcla en los experimentos (0,3 l) y el volumen de mezcla para un kg de residuos (6,0 l), la cantidad de cada uno de los ácidos grasos por kg de residuo de carnicería tratado. Esos valores, junto a los ingresos correspondientes a la venta de cada ácido, aparecen en las tablas 5.56-5.64.

Tabla 5.56.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 1 (16,38±0,04 g de lípidos recuperados)

<i>Compuesto</i>	<i>Ácido graso</i> (mg ácido graso/g lípidos)	<i>m ácido graso</i> (kg ácido graso/kg residuo)	<i>p ácido graso</i> (€)	<i>I ácidos grasos</i> (€/kg de residuo)
C14:0	24,12	7,90E-03	4,52	0,036
C15:0	1,04	3,41E-04	3,60	0,001
C16:0	166,32	5,45E-02	6,01	0,328
C16:1	0,78	2,56E-04	4,85	0,001
C17:0	14,37	4,71E-03	3,69	0,017
C17:1	3,26	1,07E-03	4,94	0,005
C18:0	117,83	3,86E-02	5,57	0,215
C18:1	206,17	6,76E-02	4,13	0,279
C18:2	114,79	3,76E-02	13,92	0,524
C18:3n3	29,13	9,54E-03	4,94	0,047
C18:3n6	0,41	1,34E-04	4,94	0,001
C20:0	2,75	9,01E-04	4,04	0,004
C20:2	24,74	8,11E-03	5,39	0,044
C20:3n3	25,40	8,32E-03	6,08	0,051
C20:3n6	15,38	5,04E-03	6,08	0,031
C20:4n6	14,44	4,73E-03	5,21	0,025
Total	760,93	2,49E-01		1,607

Tabla 5.57.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 2 (16,55±0,29 g de lípidos recuperados)

<i>Compuesto</i>	<i>Ácido graso</i> (mgácido graso/glípidos)	<i>mácido graso</i> (kgácido graso/kgresiduo)	<i>pácido graso</i> (€)	<i>Iácidos grasos</i> (€/kg de residuo)
C14:0	24,31	8,05E-03	4,52	0,036
C15:0	1,06	3,51E-04	3,60	0,001
C16:0	164,48	5,44E-02	6,01	0,327
C16:1	0,79	2,61E-04	4,85	0,001
C17:0	15,39	5,09E-03	3,69	0,019
C17:1	3,43	1,14E-03	4,94	0,006
C18:0	120,51	3,99E-02	5,57	0,222
C18:1	210,61	6,97E-02	4,13	0,288
C18:2	115,71	3,83E-02	13,92	0,533
C18:3n3	31,32	1,04E-02	4,94	0,051
C18:3n6	0,37	1,22E-04	4,94	0,001
C20:0	2,78	9,20E-04	4,04	0,004
C20:2	25,21	8,34E-03	5,39	0,045
C20:3n3	25,94	8,59E-03	6,08	0,052
C20:3n6	15,48	5,12E-03	6,08	0,031
C20:4n6	15,44	5,11E-03	5,21	0,027
Total	772,83	2,56E-01		1,644

Tabla 5.58.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 3 (17,30±0,02 g de lípidos recuperados)

<i>Compuesto</i>	<i>Ácido graso</i> (mg ácido graso/g lípidos)	<i>m ácido graso</i> (kg ácido graso/kg residuo)	<i>p ácido graso</i> (€)	<i>I ácidos grasos</i> (€/kg de residuo)
C14:0	26,57	9,19E-03	4,52	0,042
C15:0	1,13	3,91E-04	3,60	0,001
C16:0	193,85	6,71E-02	6,01	0,403
C16:1	0,88	3,04E-04	4,85	0,001
C17:0	16,71	5,78E-03	3,69	0,021
C17:1	3,63	1,26E-03	4,94	0,006
C18:0	125,12	4,33E-02	5,57	0,241
C18:1	215,99	7,47E-02	4,13	0,309
C18:2	123,10	4,26E-02	13,92	0,593
C18:3n3	33,76	1,17E-02	4,94	0,058
C18:3n6	0,45	1,56E-04	4,94	0,001
C20:0	2,98	1,03E-03	4,04	0,004
C20:2	26,53	9,18E-03	5,39	0,049
C20:3n3	26,80	9,27E-03	6,08	0,056
C20:3n6	17,40	6,02E-03	6,08	0,037
C20:4n6	17,31	5,99E-03	5,21	0,031
Total	832,21	2,88E-01		1,854

Tabla 5.59.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 4 (17,30±0,01 g de lípidos recuperados)

<i>Compuesto</i>	<i>Ácido graso</i> (mgácido graso/glípidos)	<i>m</i> ácido graso (kgácido graso/kgresiduo)	<i>p</i> ácido graso (€)	<i>I</i> ácidos grasos (€/kg de residuo)
C14:0	25,56	8,85E-03	4,52	0,040
C15:0	1,13	3,91E-04	3,60	0,001
C16:0	189,61	6,56E-02	6,01	0,394
C16:1	0,88	3,05E-04	4,85	0,001
C17:0	16,41	5,68E-03	3,69	0,021
C17:1	3,67	1,27E-03	4,94	0,006
C18:0	122,90	4,25E-02	5,57	0,237
C18:1	219,12	7,58E-02	4,13	0,313
C18:2	123,90	4,29E-02	13,92	0,597
C18:3n3	33,86	1,17E-02	4,94	0,058
C18:3n6	0,46	1,59E-04	4,94	0,001
C20:0	2,98	1,03E-03	4,04	0,004
C20:2	26,53	9,18E-03	5,39	0,049
C20:3n3	26,35	9,12E-03	6,08	0,055
C20:3n6	17,16	5,94E-03	6,08	0,036
C20:4n6	17,39	6,02E-03	5,21	0,031
Total	827,91	2,87E-01		1,847

Tabla 5.60.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 5 (17,98±0,03 g de lípidos recuperados)

<i>Compuesto</i>	<i>Ácido graso</i> (mg ácido graso/g lípidos)	<i>m ácido graso</i> (kg ácido graso/kg residuo)	<i>p ácido graso</i> (€)	<i>I ácidos grasos</i> (€/kg de residuo)
C14:0	27,69	9,96E-03	4,52	0,045
C15:0	1,18	4,24E-04	3,60	0,002
C16:0	202,19	7,27E-02	6,01	0,437
C16:1	0,94	3,38E-04	4,85	0,002
C17:0	17,57	6,32E-03	3,69	0,023
C17:1	4,03	1,45E-03	4,94	0,007
C18:0	129,23	4,65E-02	5,57	0,259
C18:1	217,73	7,83E-02	4,13	0,323
C18:2	124,08	4,46E-02	13,92	0,621
C18:3n3	35,77	1,29E-02	4,94	0,064
C18:3n6	0,46	1,65E-04	4,94	0,001
C20:0	3,10	1,12E-03	4,04	0,005
C20:2	27,11	9,75E-03	5,39	0,053
C20:3n3	27,41	9,86E-03	6,08	0,060
C20:3n6	19,45	7,00E-03	6,08	0,043
C20:4n6	18,27	6,57E-03	5,21	0,034
Total	856,21	3,08E-01		1,978

Tabla 5. 61.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 6 (18,44±0,06 g de lípidos recuperados)

<i>Compuesto</i>	<i>Ácido graso</i> (mg ácido graso/g lípidos)	<i>m ácido graso</i> (kg ácido graso/kg residuo)	<i>p ácido graso</i> (€)	<i>I ácidos grasos</i> (€/kg de residuo)
C14:0	28,63	1,06E-02	4,52	0,048
C15:0	1,22	4,50E-04	3,60	0,002
C16:0	211,01	7,78E-02	6,01	0,468
C16:1	0,97	3,58E-04	4,85	0,002
C17:0	17,93	6,61E-03	3,69	0,024
C17:1	4,14	1,53E-03	4,94	0,008
C18:0	129,82	4,79E-02	5,57	0,267
C18:1	229,02	8,45E-02	4,13	0,349
C18:2	132,77	4,90E-02	13,92	0,682
C18:3n3	37,39	1,38E-02	4,94	0,068
C18:3n6	0,50	1,84E-04	4,94	0,001
C20:0	3,21	1,18E-03	4,04	0,005
C20:2	28,04	1,03E-02	5,39	0,056
C20:3n3	27,72	1,02E-02	6,08	0,062
C20:3n6	20,29	7,48E-03	6,08	0,046
C20:4n6	20,55	7,58E-03	5,21	0,039
Total	893,21	3,29E-01		2,125

Tabla 5.62.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 7 (18,06±0,07 g de lípidos recuperados)

<i>Compuesto</i>	<i>Ácido graso</i> (mg ácido graso/g lípidos)	<i>m ácido graso</i> (kg ácido graso/kg residuo)	<i>p ácido graso</i> (€)	<i>I ácidos grasos</i> (€/kg de residuo)
C14:0	27,99	1,01E-02	4,52	0,046
C15:0	1,21	4,37E-04	3,60	0,002
C16:0	211,25	7,63E-02	6,01	0,459
C16:1	0,95	3,43E-04	4,85	0,002
C17:0	17,33	6,26E-03	3,69	0,023
C17:1	4,01	1,45E-03	4,94	0,007
C18:0	129,10	4,66E-02	5,57	0,260
C18:1	214,98	7,77E-02	4,13	0,321
C18:2	132,16	4,77E-02	13,92	0,664
C18:3n3	36,38	1,31E-02	4,94	0,065
C18:3n6	0,50	1,81E-04	4,94	0,001
C20:0	3,13	1,13E-03	4,04	0,005
C20:2	27,32	9,87E-03	5,39	0,053
C20:3n3	27,83	1,01E-02	6,08	0,061
C20:3n6	19,15	6,92E-03	6,08	0,042
C20:4n6	19,26	6,96E-03	5,21	0,036
Total	872,55	3,15E-01		2,046

Tabla 5.63.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 8 (18,00±0,02 g de lípidos recuperados)

<i>Compuesto</i>	<i>Ácido graso</i> (mg ácido graso/g lípidos)	<i>m ácido graso</i> (kg ácido graso/kg residuo)	<i>p ácido graso</i> (€)	<i>I ácidos grasos</i> (€/kg de residuo)
C14:0	27,87	1,00E-02	4,52	0,045
C15:0	1,18	4,25E-04	3,60	0,002
C16:0	199,74	7,19E-02	6,01	0,432
C16:1	0,95	3,42E-04	4,85	0,002
C17:0	17,64	6,35E-03	3,69	0,023
C17:1	4,09	1,47E-03	4,94	0,007
C18:0	129,18	4,65E-02	5,57	0,259
C18:1	217,40	7,82E-02	4,13	0,323
C18:2	128,91	4,64E-02	13,92	0,646
C18:3n3	36,30	1,31E-02	4,94	0,065
C18:3n6	0,48	1,73E-04	4,94	0,001
C20:0	2,97	1,07E-03	4,04	0,004
C20:2	27,29	9,82E-03	5,39	0,053
C20:3n3	27,23	9,80E-03	6,08	0,060
C20:3n6	17,96	6,46E-03	6,08	0,039
C20:4n6	18,50	6,66E-03	5,21	0,035
Total	857,69	3,09E-01		1,995

Tabla 5.64.- Ingresos por venta de ácidos grasos en el experimento 9 (18,44±0,04 g de lípidos recuperados)

<i>Compuesto</i>	<i>Ácido graso</i> (mgácido graso/glípidos)	<i>m</i> ácido graso (kgácido graso/kgresiduo)	<i>p</i> ácido graso (€)	<i>I</i> ácidos grasos (€/kg de residuo)
C14:0	28,30	1,04E-02	4,52	0,047
C15:0	1,21	4,46E-04	3,6	0,002
C16:0	215,99	7,97E-02	6,01	0,479
C16:1	0,97	3,58E-04	4,85	0,002
C17:0	18,03	6,65E-03	3,69	0,025
C17:1	4,21	1,55E-03	4,94	0,008
C18:0	132,95	4,90E-02	5,57	0,273
C18:1	237,06	8,74E-02	4,13	0,361
C18:2	132,75	4,90E-02	13,92	0,682
C18:3n3	37,41	1,38E-02	4,94	0,068
C18:3n6	0,50	1,84E-04	4,94	0,001
C20:0	3,19	1,18E-03	4,04	0,005
C20:2	28,09	1,04E-02	5,39	0,056
C20:3n3	28,25	1,04E-02	6,08	0,063
C20:3n6	19,95	7,36E-03	6,08	0,045
C20:4n6	20,73	7,65E-03	5,21	0,040
Total	909,59	3,35E-01		2,155

Conocidos los ingresos por ventas de los ácidos grasos se calcularon los ingresos por ventas del hidrolizado enzimático y del colágeno no hidrolizado cuyos precios según los suministradores son de 25,52 €/kg y 24,15 €/kg, respectivamente, y cuyas cantidades son las que aparecen en las tablas IV.11 y IV. 12 del Anexo IV. En la tabla 5.65 se incluye un resumen de los ingresos por ventas de los diferentes productos obtenido en los experimentos.

Tabla 5.65.- Ingresos por venta de los productos obtenidos en los experimentos

<i>Experimento</i>	<i>Iácidos grasos (€/kg de residuo)</i>	<i>Ihidrolizado proteico (€/kg de residuo)</i>	<i>Icolágeno no hidrolizado (€/kg de residuo)</i>
1	1,607	1,406	0,529
2	1,644	1,332	0,553
3	1,854	1,424	0,501
4	1,847	1,352	0,544
5	1,987	1,574	0,458
6	2,125	1,797	0,418
7	2,046	1,724	0,426
8	1,995	1,767	0,421
9	2,155	1,852	0,377

5.5.3. Rentabilidad del proceso

La rentabilidad del proceso (R) se calculó por diferencia entre los ingresos totales por ventas (I_T) y los costes de tratamiento (C_T):

$$R = I_T - C_T \quad \text{Ec. 5.83}$$

Los ingresos totales por ventas determinados a partir de la ecuación 5.83 y los costes de tratamiento obtenidos en el apartado 5.5.2 se han resumido en la tabla 5.66.

Tabla 5.66.- Rentabilidad del proceso

<i>Experimento</i>	<i>Eo/So</i> (UA/g)	<i>Eo'/So'</i> (kLU/g)	<i>pH</i>	<i>T</i> (°C)	<i>I_T</i> (€/kg de residuo)	<i>C_T</i> (€/kg de residuo)	<i>R</i> (€/kg de residuo)
1	0,11	0,55	7.5	45	3,542	1,650	1,892
2	0,11	0,83	8.0	50	3,529	2,030	1,499
3	0,11	1,11	8.5	55	3,779	2,415	1,364
4	0,16	0,55	8.0	55	3,743	2,095	1,648
5	0,16	0,83	8.5	45	4,019	2,425	1,594
6	0,16	1,11	7.5	50	4,340	2,810	1,530
7	0,21	0,55	8.5	50	4,196	2,480	1,716
8	0,21	0,83	7.5	55	4,183	2,870	1,313
9	0,21	1,11	8.0	45	4,384	3,200	1,184

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento más rentable, dentro de los elegidos por ser los más adecuados, es el que se lleva a cabo a menor relación proteasa/sustrato proteico, menor relación lipasa/sustrato lipídico, menor pH y menor temperatura ya que con él se obtienen cantidades elevadas de productos recuperados y, sin embargo, los costes de las enzimas y los costes caloríficos son los más económicos.

En la tabla 5.66 se puede observar cómo, en los experimentos realizados, los beneficios oscilan entre 1 y 2 € por cada kg de residuo de carnicería tratado. Para saber si este valor es aceptable o desaconseja el tratamiento propuesto, se ha comparado con el beneficio actualmente obtenido con la venta de los residuos de carnicería.

En la actualidad, el destino de los residuos de carnicería que no van a vertedero es su transformación en harina para alimentación animal. El precio de venta de la harina de carne y huesos está en torno a 0,5 €/kg de harina, y considerando que la harina contiene exclusivamente carne y huesos, es decir que es 100 % residuo, ese precio se puede expresar como 0,5 €/kg de residuo. Teniendo en cuenta que ese es el valor del ingreso por venta al que habría que descontar los costes del proceso de obtención de la harina (que tiene que incluir, como mínimo, secado, molienda y tamizado) el beneficio por venta de la harina obtenida a partir de los residuos de carnicería será inferior a 0,5 €/kg ya que, aunque la molienda y el tamizado tengan un coste despreciable, no ocurre lo mismo con la etapa de secado.

De acuerdo con esto se aprecia que el beneficio obtenido en la transformación de los residuos de carnicería en hidrolizados proteicos, colágeno y ácidos grasos sería, en el peor de los casos, tres veces superior al obtenido con la transformación de los residuos de carnicería en harina lo que hace altamente recomendable el tratamiento enzimático propuesto en esta tesis. Dada la alta rentabilidad de dicho proceso, se evitaría también que se llevara a vertedero una gran parte de los residuos de carnicería que a día de hoy todavía se están llevando.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

6. Conclusiones

Del estudio realizado sobre la obtención de subproductos con elevado valor añadido a partir de residuos de productos cárnicos destinados al consumo humano se han sacado una serie de conclusiones que se pueden estructurar de acuerdo con los estudios llevados a cabo tal y como se muestra a continuación:

1. Caracterización del sustrato

- ✓ El residuo de productos cárnicos destinados a consumo humano destaca por su alto contenido proteico y lipídico.
- ✓ Dentro de las proteínas presentes en el residuo, predomina una proteína de origen exclusivamente animal: el colágeno.
- ✓ En la composición de los lípidos del residuo resulta mayoritario el porcentaje de ácidos saturados frente al de monoinsaturados o el de poliinsaturados.
- ✓ Los residuos de carnicerías presentan unas características en cuanto a contenido en proteínas y lípidos que los hacen susceptibles de ser utilizados como materia prima para la obtención de otros productos de mayor valor añadido
- ✓ La transformación enzimática de esos residuos permite obtener hidrolizados proteicos, colágeno y ácidos grasos.

2. Hidrólisis con proteasas de la fracción proteica del residuo

- ✓ Las endopeptidasas de tipo proteína serina y origen bacteriano resultan ser más adecuadas en la hidrólisis de la fracción proteica de los residuos de carnicerías cuando lo que se desea es alcanzar un elevado grado de hidrólisis y, por tanto, una mayor cantidad de hidrolizado proteico.
- ✓ Las características de la proteasa utilizada parecen no ser determinantes en las cantidades de residuo cárnico no transformado y de proteína solubilizada, en la recuperación del colágeno o los lípidos del residuo o en la distribución de ácidos

grasos presentes en la fracción lipídica recuperada siendo el factor determinante el grado de hidrólisis de la fracción proteica alcanzado con la proteasa.

- ✓ El grado de hidrólisis de la fracción proteica alcanzado resulta fundamental en la cantidad de sólido residual tras la transformación enzimática y en la cantidad de proteína hidrolizada y, por tanto, solubilizada, observándose una relación inversa en el primer caso y directa en el segundo.
- ✓ El grado de hidrólisis de la fracción proteica alcanzado también resulta esencial en la recuperación del colágeno observándose una relación inversa entre ambos.
- ✓ La influencia del grado de hidrólisis de la fracción proteica es primordial en la recuperación de los lípidos del residuo, comprobándose que el porcentaje recuperado se incrementa al aumentar el grado de hidrólisis alcanzado.
- ✓ La distribución de ácidos grasos en la fracción lipídica recuperada es la misma que en el residuo cárnico lo que indica que la hidrólisis de la fracción proteica del residuo permite la recuperación de los lípidos sin afectar su calidad.
- ✓ La obtención predominante de unos productos finales u otros es función del grado de hidrólisis de la fracción proteica alcanzado en el proceso y un valor concreto del mismo puede obtenerse, para un mismo tipo de enzima, variando las condiciones de operación, o, para unas mismas condiciones de operación, variando la enzima utilizada en el proceso.
- ✓ El grado de hidrólisis de la fracción proteica alcanzado es función, además del tipo de proteasa utilizada, de cuatro variables de operación: relación entre la concentración inicial de enzima y la concentración inicial de la fracción proteica en el sustrato, pH, temperatura y tiempo de hidrólisis.
- ✓ Dentro del intervalo ensayado para las variables de operación, los grados de hidrólisis de la fracción proteica más elevados corresponden a las relaciones más altas entre la concentración inicial de proteasa y la concentración inicial de la fracción proteica en el sustrato, a los pH más altos y a las temperaturas más bajas.
- ✓ El grado de hidrólisis de la fracción proteica no varía significativamente a tiempos de hidrólisis superiores a cuatro horas.

- ✓ Los hidrolizados proteicos de mejor calidad (masa molar media del producto final próxima a 500 Daltons) serían los obtenidos:
 - A pH 8 y 50°C, para relaciones de concentraciones proteasa/sustrato proteico entre 0,11 y 0,16 UA/g.
 - Para relaciones de concentraciones proteasa/sustrato proteico de 0,11 UA/g, entre 7,5 y 8,0 de pH y 50 y 55°C de temperatura
- ✓ La cinética de la reacción de hidrólisis de la fracción proteica del residuo de carnicerías ajusta satisfactoriamente a una ecuación tipo Elovich.
- ✓ El mecanismo de la reacción propuesto para justificar esa ecuación, de acuerdo con los resultados obtenidos, corresponde a un proceso de hidrólisis enzimática con inhibición por sustrato y producto y con desactivación enzimática de orden dos.

3. Hidrólisis con lipasas de la fracción lipídica del residuo

- ✓ Las lipasas procedentes de levaduras son menos eficaces que las lipasas de origen fúngico en la hidrólisis de lípidos para liberar los ácidos grasos que los componen.
- ✓ Las lipasas con especificidad para hidrolizar sustratos formados por triglicéridos son más eficaces para la producción de ácidos grasos que las lipasas con especificidad para hidrolizar sustratos formados por ésteres.
- ✓ La hidrólisis de los lípidos presentes en el residuo libera las proteínas también presentes en él, favoreciendo de ese modo cierta hidrólisis de la fracción proteica del sustrato con el agua presente en el medio y, en consecuencia, la solubilización de parte de la proteína.
- ✓ Las características de la lipasa utilizada parecen no ser determinantes en las cantidades de ácidos grasos liberados de la fracción lipídica, de residuo cárnico no transformado y de proteína solubilizada, y en la recuperación del colágeno del residuo siendo el factor determinante el grado de hidrólisis de la fracción lipídica alcanzado con la lipasa.

- ✓ La influencia del grado de hidrólisis de la fracción lipídica es primordial en la recuperación de los ácidos grasos liberados a partir de los lípidos del residuo, comprobándose que la cantidad liberada aumenta al incrementarse el grado de hidrólisis alcanzado de acuerdo con una relación lineal.
- ✓ El grado de hidrólisis de la fracción lipídica alcanzado resulta fundamental en la cantidad de sólido residual tras la transformación enzimática observándose una clara disminución con el aumento del grado de hidrólisis.
- ✓ El grado de hidrólisis de la fracción lipídica alcanzado no modifica significativamente la cantidad de proteína solubilizada ya que es debida a la hidrólisis de la proteína y ésta se debe exclusivamente al agua ya que las lipasas no favorecen la hidrólisis de proteínas y no había proteasas en el medio.
- ✓ El porcentaje de colágeno recuperado es independiente del grado de hidrólisis de la fracción lipídica alcanzado durante el proceso debido a su mayor resistencia a la hidrólisis con agua en ausencia de proteasas.
- ✓ La obtención predominante de unos productos finales u otros es función del grado de hidrólisis de la fracción lipídica alcanzado en el proceso y un valor concreto del mismo puede obtenerse, para un mismo tipo de enzima, variando las condiciones de operación, o, para unas mismas condiciones de operación, variando la enzima utilizada en el proceso.
- ✓ El grado de hidrólisis de la fracción lipídica alcanzado es función, además del tipo de lipasa utilizada, de cuatro variables de operación: relación entre la concentración inicial de lipasa y la concentración inicial de la fracción lipídica en el sustrato, pH, temperatura y tiempo de hidrolisis.
- ✓ Dentro del intervalo ensayado para las variables de operación, los grados de hidrólisis de la fracción lipídica más elevados corresponden a las relaciones más altas entre la concentración inicial de lipasa y la concentración inicial de la fracción lipídica en el sustrato, a los pH más altos y a las temperaturas más bajas.
- ✓ El grado de hidrólisis de la fracción lipídica no varía significativamente a tiempos de hidrolisis superiores a cuatro horas.

- ✓ Para grados de hidrólisis de la fracción lipídica superiores al 90 % no hay variaciones notables en las cantidades de ácidos grasos obtenidas que justifiquen el coste adicional de alcanzar grados de hidrólisis más altos; por ello, es recomendable:
 - A pH 8 y 50°C, trabajar con relaciones de concentraciones lipasa/sustrato lipídico en torno a 0,83 kLU/g.
 - Para relaciones de concentraciones lipasa/sustrato lipídico de 0,83 kLU/g, trabajar a pH inferior a 8,0 a 50°C o temperaturas inferiores a 50°C a pH 8,0.
- ✓ La cinética de la reacción de hidrólisis de la fracción lipídica del residuo de carnicerías ajusta satisfactoriamente a una ecuación tipo Elovich.
- ✓ El mecanismo de la reacción propuesto para justificar esa ecuación, según con los resultados obtenidos, corresponde a un proceso de hidrólisis enzimática con inhibición por producto y con desactivación enzimática de orden dos.

4. Hidrólisis con mezcla de proteasa y lipasa

- ✓ La metodología Taguchi aplicada para el diseño factorial de experimentos seleccionando tres niveles para cada uno de los cuatro factores de control estudiados (arreglo ortogonal L_9) ha resultado totalmente adecuada para el estudio.
- ✓ Las variables de operación (factores de control), que resultan ser controlantes, son la relación entre la concentración inicial de proteasa y la concentración inicial de sustrato proteico (E_0/S_0), la relación entre la concentración inicial de lipasa y la concentración inicial de sustrato lipídico (E_0'/S_0'), el pH y la temperatura.
- ✓ Los niveles para los factores de control se seleccionan en el intervalo en el que se consigue la relación más adecuada entre la cantidad de hidrolizado proteico producida, la cantidad de colágeno sin hidrolizar, la cantidad de ácidos grasos producida y la cantidad de residuo sin solubilizar, de acuerdo con los estudios previos.

- ✓ El estudio del índice factor/ruido indica que:
 - Cuando la variable objetivo es el porcentaje de proteína solubilizada o el porcentaje de lípidos recuperados, las relaciones Eo/So y Eo'/So' son los factores que mayor influencia poseen sobre la variable respuesta, siendo la temperatura el factor que tiene menor influencia.
 - Cuando la variable objetivo es el porcentaje de colágeno no hidrolizado, los factores dados por las relaciones Eo/So y Eo'/So' tienen la influencia más notable sobre la variable respuesta, siendo el pH el factor que tiene menos influencia.
 - Cuando la variable objetivo es el porcentaje de residuo no solubilizado, la relación Eo/So y el pH causan un mayor efecto sobre la variable respuesta, siendo la temperatura el factor menos determinante.

- ✓ El análisis de varianza ANOVA para el ajuste cuadrático con interacción de variables utilizado como modelo experimental señala que:
 - Cuando la variable objetivo es el porcentaje de proteína solubilizada, los términos que tienen mayor efecto en la variable de respuesta son (Eo/So) , $(Eo/So \cdot Eo/So)$, $(Eo'/So' \cdot Eo'/So')$, $(pH \cdot pH)$, $(Eo/So \cdot pH)$ y $(Eo'/So' \cdot pH)$, siendo (Eo/So) , $(Eo/So \cdot Eo/So)$ y $(Eo'/So' \cdot pH)$ los términos que más influyen en la solubilidad de la proteína.
 - Cuando la variable objetivo es el porcentaje de lípidos recuperados, los términos que tienen mayor efecto en la variable de respuesta son (Eo/So) , (Eo'/So') , $(Eo/So \cdot Eo/So)$, $(Eo'/So' \cdot Eo'/So')$, $(Eo/So \cdot Eo'/So')$, $(Eo/So \cdot pH)$ y $(Eo'/So' \cdot pH)$, siendo (Eo/So) , (Eo'/So') , $(Eo/So \cdot Eo/So)$ y $(Eo/So \cdot Eo'/So')$ los términos que más influyen en la recuperación de lípidos..
 - Cuando la variable objetivo es el porcentaje de colágeno no hidrolizado, los términos del modelo significativos que tienen

mayor efecto en la variable de respuesta son (Eo/So) , $(Eo/So \cdot Eo/So)$, $(Eo'/So' \cdot Eo'/So')$, $(pH \cdot T)$, siendo (Eo/So) , $(Eo/So \cdot Eo/So)$ y $(Eo/So \cdot Eo'/So')$ los términos que más influencia tienen en la recuperación de colágeno no hidrolizado.

- Cuando la variable objetivo es el porcentaje de residuo no solubilizado, los términos que tienen mayor efecto en la variable de respuesta son (Eo/So) , (Eo'/So') , (pH) , $(Eo/So \cdot Eo/So)$, $(Eo'/So' \cdot Eo'/So')$, $(T \cdot T)$, $(Eo/So \cdot Eo'/So')$, $(Eo/So \cdot pH)$, $(Eo'/So' \cdot pH)$, siendo $(Eo/So \cdot Eo/So)$, $(Eo'/So' \cdot Eo'/So')$, $(Eo/So \cdot Eo'/So')$ y $(Eo/So \cdot pH)$ los términos que más influencia tienen en el porcentaje de residuo no solubilizado.

✓ El estudio de las gráficas de superficie de respuesta y de contorno muestra que:

- Cuando la variable objetivo es el porcentaje de proteína solubilizada, se pueden alcanzar valores máximos por combinación de valores de Eo/So entre 0,60 y 0,80 UA/g, de Eo'/So' entre 0,40 y 1,20 kLU/g, de pH entre 7 y 8 y de temperatura entre 40 y 50°C.
- Cuando la variable objetivo es el porcentaje de lípidos recuperados, se pueden alcanzar valores máximos por combinación de valores de Eo/So entre 0,00 y 0,40 UA/g, de Eo'/So' entre 0,00 y 0,50 kLU/g, de pH entre 7 y 9 y de temperatura entre 40 y 60°C.
- Cuando la variable objetivo es el porcentaje de colágeno no hidrolizado, para alcanzar valores máximos es imprescindible que los valores de Eo/So sean próximos a 0,00, pudiendo oscilar los valores de Eo'/So' entre 0,00 y 1,20 kLU/g, de pH entre 7 y 9 y de temperatura entre 40 y 60°C.
- Cuando la variable objetivo es el porcentaje de residuo no solubilizado, se pueden alcanzar valores mínimos por combinación de valores de Eo/So entre 0,15 y 0,55 UA/g, de Eo'/So' entre 0,00 y 0,90 kLU/g, de pH entre 7 y 9 y de temperatura entre 40 y 60°C.

- ✓ El análisis de optimización de respuesta permite determinar que:
 - Cuando la variable objetivo es el porcentaje de proteína solubilizada, para obtener un valor del 100 % que corresponde a la máxima cantidad de hidrolizado proteico, es preciso trabajar con una relación de concentraciones de proteasa/sustrato proteico de 0,75 UA/g, una relación de concentraciones de lipasa/sustrato lipídico de 1,17 kLU/g, un pH de 7,75 y una temperatura de 50°C.
 - Cuando la variable objetivo es el porcentaje de lípidos recuperados, para obtener un valor del 100 % que corresponde a la máxima cantidad de ácidos grasos liberados, basta con trabajar con una relación de concentraciones de proteasa/sustrato proteico de 0,05 UA/g, una relación de concentraciones de lipasa/sustrato lipídico de 0,38 kLU/g, un pH de 9,0 y una temperatura de 40°C.
 - Cuando la variable objetivo es el porcentaje de colágeno no hidrolizado, para obtener un valor del 100 % y recuperar al máximo el colágeno contenido en el residuo de carnicería, es preciso trabajar con una relación de concentraciones de proteasa/sustrato proteico de 0,01 UA/g, una relación de concentraciones de lipasa/sustrato lipídico de 0,84 kLU/g, un pH de 9,0 y una temperatura de 40°C.
 - Cuando la variable objetivo es el porcentaje de residuo no solubilizado, para obtener un valor del 0 % y que no quede nada de residuo que sea necesario llevar a vertedero, es preciso trabajar con una relación de concentraciones de proteasa/sustrato proteico de 0,49 UA/g, una relación de concentraciones de lipasa/sustrato lipídico de 0,97 kLU/g, un pH de 7,05 y una temperatura de 60°C.

5. Evaluación económica del tratamiento

- ✓ De las enzimas ensayadas, las más económica en cuanto a relación coste-rendimiento alcanzado en el proceso han sido Alcalase y Resinase.
- ✓ Los costes de la etapa de reacción son función del coste de reactivos y catalizadores y el coste calorífico.
- ✓ El coste de reactivos y catalizadores está solo determinado por el coste de las enzimas, siendo el coste de reactivos despreciable en el proceso, y oscila entre 0,30 y 0,65 € por kg de residuo de carnicería tratado en las condiciones de operación analizadas.
- ✓ El coste calorífico depende del calentamiento necesario de la mezcla reaccionante para alcanzar la temperatura de hidrólisis y el correspondiente al mantenimiento de esa temperatura durante el tiempo de reacción.
- ✓ El calor correspondiente al mantenimiento de temperatura es función de las pérdidas de calor y del calor de las reacciones siendo éste despreciable en relación con aquel.
- ✓ Los costes de la etapa de reacción están determinados por el coste de las enzimas, representando en torno al 95 % del coste total de la etapa de reacción en los experimentos estudiados.
- ✓ Los costes de la etapa de separación y purificación de productos se han estimado un 80 % de los costes totales de tratamiento del residuo.
- ✓ El coste de tratamiento (suma de costes de las etapas de reacción y separación y purificación de productos) oscila entre 1,65 y 3,20 € por kg de residuo de carnicería tratado en las condiciones de operación analizadas.
- ✓ Los ingresos por venta de los productos incluyen la venta del hidrolizado proteico, del colágeno no hidrolizado y de los ácidos grasos liberados.
- ✓ En los experimentos analizados, los ingresos por venta de hidrolizado proteico oscilan entre 1,30 y 1,85, los ingresos por venta de colágeno no hidrolizado oscilan entre 0,40 y 0,55 y los ingresos por venta de ácidos grasos oscilan entre 1,60 y 2,20 €/kg de residuo de carnicería tratado.

- ✓ El beneficio obtenido por venta de los productos obtenidos a partir del tratamiento enzimático con mezcla de proteasa y lipasa oscilan entre 1 y 2 € por cada kg de residuo de carnicería tratado.

- ✓ El beneficio económico obtenido en el tratamiento de los residuos de productos cárnicos destinados al consumo humano con mezclas de proteasa y lipasa para la producción de hidrolizado proteico, colágeno no hidrolizado y ácidos grasos es, en las condiciones más desfavorables de operación, tres veces superior al obtenido con la transformación habitualmente usada de esos residuos en harina lo que hace altamente recomendable el tratamiento enzimático propuesto en esta tesis.

**CAPÍTULO VII:
NOMENCLATURA**

7. Nomenclatura

a : Coeficiente de la ecuación 5.35.

a_p : Actividad de la proteasa (UA).

a_L : Actividad de la lipasa (kLU).

A : Actividad enzimática.

A_o : Actividad enzimática inicial.

$A_{muestra}$: Actividad enzimática de la proteasa analizada (UA/l).

A_t : Área de transferencia de calor (m^2).

b : Coeficiente de la ecuación 5.35.

B : Consumo de NaOH en la hidrólisis enzimática (l).

$C_{éster_i}$: Concentración de éster metílico presente en la muestra ($ng/\mu l$).

c_p : Capacidad calorífica de la masa a calentar en el reactor ($kJ/kg\ ^\circ C$).

C : Cenizas (%).

C_C : Coste calorífico ($\text{€}/kg$ residuo).

C_{ER} : Costes de la etapa de reacción ($\text{€}/kg$ residuo).

C_{ES} : Costes de la etapa de separación de productos ($\text{€}/kg$ residuo).

C_R : Coste de los reactivos y los catalizadores ($\text{€}/kg$ residuo).

C_T : Costes de tratamiento ($\text{€}/kg$ residuo).

E: Enzima.

E_a: Enzima activa.

E_i: Enzima desactivada.

E_o: Concentración inicial de proteasa (UA/l).

E_o': Concentración inicial de lipasa (kLU/l).

EP: Complejo enzima-producto.

ES: Complejo enzima-sustrato.

[E]: Concentración de enzima (UA/l).

f: Valor de dato para estudios estadísticos.

f_s: Valor superior de la serie de medidas.

f_i: Valor inferior de la serie de medidas.

\bar{f} : Valor medio de la serie de medidas.

g_{AG_i}: Cantidad de ácido graso *i* presente en muestra (g).

g_{éster_i}: Cantidad de éster metílico *i* en la muestra (g).

g_{muestra}: Cantidad de muestra presente en la disolución preparada para identificar los ésteres metílicos (g).

GH: Grado de hidrólisis de la fracción proteica (%).

GH': Grado de hidrólisis de la fracción lipídica (%).

$h_{muestra}$: Humedad de la muestra (%).

h_{total} : Número de enlaces peptídicos en la proteína (eq-g/kg).

$I_{ácidos\ grasos}$: Ingresos por venta de los ácidos grasos (€/kg de residuo de carnicería).

$I_{colágeno\ no\ hidrolizado}$: Ingresos por venta del colágeno no hidrolizado (€/kg de residuo de carnicería).

$I_{hidrolizado\ proteico}$: Ingresos por venta del hidrolizado proteico (€/kg de residuo de carnicería).

I_T : Ingresos totales por ventas (€/kg de residuo de carnicería).

$k_1, k_{-1}, k_2, k_3, k_{-3}, k_4, k_{-4}, k_5, k_d$: Constantes cinéticas de reacción con proteasa.

$k_1', k_{-1}', k_2', k_3', k_{-3}', k_d'$: Constantes cinéticas de reacción con lipasa.

K : Constante del equilibrio de desprotonización del grupo amino.

K_I : Constante de inhibición competitiva.

K_I' : Constante de inhibición acompetitiva.

K_m : Constante de Michaelis-Menten.

K_M : Constante de Michaelis-Menten para el sustrato proteico (g/l).

K_M' : Constante de Michaelis-Menten para el sustrato lipídico (g/l).

K_P : Constante de inhibición por productos proteicos.

K_S : Constante de inhibición por sustrato proteico.

K_{sat} : Constante de saturación.

K_I : Parámetro cinético de la hidrólisis enzimática de proteínas (min^{-1}).

K_I' : Parámetro cinético de la hidrólisis enzimática de lípidos (min^{-1}).

K_2 : Parámetro cinético de la hidrólisis enzimática de proteínas.

K_2' : Parámetro cinético de la hidrólisis enzimática de lípidos.

LCP : Longitud media de la cadena peptídica.

$L_{muestra}$: Contenido de lípidos en la muestra seca (%).

$m_{ácido\ graso}$: Cantidad de cada ácido graso obtenido (kg/kg de residuo de carnicería).

m_c : Masa a calentar en el reactor (kg).

$m_{colágeno\ no\ hidrolizado}$: Cantidad de colágeno no hidrolizado obtenido (kg/kg de residuo de carnicería).

$m_{hidrolizado\ proteico}$: Cantidad de hidrolizado proteico obtenido equivalente a la cantidad de proteína solubilizada (kg/kg de residuo de carnicería).

$m_{muestra}$: Cantidad de muestra introducida en el reactor (kg).

M_B = Molaridad de la base (mol/l).

MM : Masa molar media de péptidos (Dalton).

M_P : Masa de proteína (kg).

M_L : Masa de lípidos puesta en el reactor (kg).

n : número de valores acumulados.

N : Nitrógeno (g).

N_B : Normalidad del NaOH.

N_{HCl} : Normalidad del HCl.

N_{NaOH} : Normalidad de NaOH

$p_{\text{ácido graso}}$: Precio de cada ácido graso (€/kg de residuo de carnicería).

$p_{\text{colágeno no hidrolizado}}$: Precio del colágeno no hidrolizado (€/kg de residuo de carnicería).

$p_{\text{hidrolizado proteico}}$: Precio del hidrolizado proteico (€/kg de residuo de carnicería).

p_p : Precio por unidad de actividad de proteasa (€/UA).

p_L : Precio por unidad de actividad de lipasa (€/kLU).

$[P]$: Concentración de producto (g/l).

PB : Proteína bruta (%).

PM : Peso molecular medio de ácidos grasos (Dalton).

PM_{AG_i} : Peso molecular del ácido graso i (Dalton).

$PM_{\text{Éster}_i}$: Peso molecular del éster metílico del ácido graso i (Dalton).

$P_{\text{estándar}}$: Pendiente de la recta de calibrado para determinación de actividad de proteasas.

P_{muestra} = Contenido de proteína en la muestra seca (%).

Q : Calor implicado en cada tratamiento (kJ/kg de residuo).

Q_C : Calentamiento de la mezcla reaccionante (kJ/kg de residuo).

Q_m : Calor correspondiente al mantenimiento de la temperatura durante el tiempo de reacción (kJ/kg de residuo).

Q_P : Calor perdido en el reactor (kJ/kg de residuo).

Q_R : Calor de reacción (kJ/kg de residuo).

R : Rentabilidad del proceso (€/kg de residuo de carnicería).

s^2 : Varianza.

S : Sustrato.

S_0 : Concentración inicial de sustrato proteico (g/l).

S_0' : Concentración inicial de sustrato lipídico

(g/l). $[S]$: Concentración de sustrato (g/l).

t : Tiempo de reacción (min).

T : Temperatura de reacción ($^{\circ}\text{C}$).

T_{amb} : temperatura ambiente ($^{\circ}\text{C}$).

T_0 : Temperatura de entrada al reactor de la mezcla reaccionante ($^{\circ}\text{C}$).

T_E : variable estadística.

U : Coeficiente global de transmisión de calor ($\text{W}/\text{m}^2\ ^{\circ}\text{C}$).

v : Velocidad de hidrólisis de proteínas ($\text{g}/\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$).

v' : Velocidad de hidrólisis de lípidos ($\text{g}/\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$).

v_{max} : Velocidad máxima de reacción ($\text{g}/\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$).

v_0 : Velocidad inicial de reacción de determinación de actividad de lipasas (mM/min).

V : Volumen de mezcla en el reactor (l).

V_{NaOH} = Volumen de solución de NaOH utilizado en el ensayo de actividad de lipasas (ml).

V_{NaOH} : Volumen de solución de NaOH utilizado en la prueba en blanco del ensayo de actividad de lipasas (ml).

V_d : Volumen de disolución preparada para identificar los ésteres metílicos (l).

V_0 : HCl consumido en la valoración del blanco para determinación de proteínas (ml).

V_I : HCl consumido en la valoración de la muestra problema para determinación de proteínas (ml).

x : Grado de hidrólisis de proteínas (%).

x' : Grado de hidrólisis de lípidos (%).

X : Factores.

Y : Variable de respuesta.

α : Grado de disociación de grupos α -amino.

β : Parámetro de ecuaciones de superficie de respuesta.

y_2 : Actividad específica de cada enzima intermedia respecto a la inicial.

δ_1, δ_2 : Parámetros cinéticos de la desactivación de la enzima en modelos en serie.

$\Delta Ab_{muestra}$: Diferencia entre las absorbancias medidas de la muestra y el blanco para determinación de actividad de proteasas.

ΔE_a : Energía de activación (J/mol).

ΔE_d : Energía de desactivación (J/mol).

ΔH_{R1} : Entalpia de reacción para la hidrólisis de los enlaces peptídicos (kJ/mol)

ΔH_{R2} : Entalpia de reacción para la hidrólisis de los enlaces lipídicos (kJ/mol).

ε : Error experimental.

$\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3 \dots$: Parámetros cinéticos para desactivación enzimática en modelos complejos.

μ : Media o promedio de la distribución.

φ_1, φ_2 : Parámetros cinéticos de la desactivación de la enzima en modelos en paralelo.

$c\varphi_1, c\varphi_2, c\varphi_3 \dots$: Constantes de integración.

CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA

8. Revisión Bibliográfica

- Abe, K., Gomi, K., Hasegawa, F., Machida, M. (2006). Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. *Mycopathologia* 162, 143-153.
- Acosta, E., Benitez, R., Lenis, L., Concha, J. (2015). Optimization of enzymatic hydrolysis of proteins present in seeds of guandul (*cajanus cajan*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 13(2), 114-122.
- Adler-Nissen, J. (1976). Enzymatic hydrolysis of proteins for increases solubility. *Agricultural and Food Chemistry* 24(6), 1090-1093.
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Ahnoff, M., Cazares, L.H., Sköld, K. (2015). Thermal inactivation of enzymes and pathogens in biosamples for MS analysis. *Bioanalysis* 7(15), 1885-1899.
- Alcántara, A.R. (2016). Industrial Biotechnology and Commodity Products. En: Bradshaw, R.A. y Stahl, P.D. (eds.). *Encyclopedia of Cell Biology*. Waltham: Academic Press. pp. 327-328.
- Aldai, N., Osoro, K., Barrón, L.J.R., Nájera, A.I. (2006). Gas-liquid chromatographic method for analysing complex mixtures of fatty acids including conjugated linoleic acids (*cis9trans11* and *trans10cis12* isomers) and long-chain (n-3 or n-6) polyunsaturated fatty acids. Application to the intramuscular fat of beef meat. *Journal of Chromatography A*, 1110, 133-139.
- Ali, Z., Waheed, A., Iqbal, H., Siddiqui, S., Parveen, Z. (2016). *Trans* fat, fatty acids and characteristics of slaughtered buffalo waste fat by edible rendering. *Buffalo Bulletin* 35(2), 199-207.
- Al-Zuhair, S., Hasan, M., Ramachandran, K.B. (2003). Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm by lipase. *Process Biochemistry* 38, 1155-1163.
- Al-Zuhair, S. (2006). Kinetics of hydrolysis of tributyrin by lipase. *Journal of Engineering Science and Technology* 1(1), 50-58.
- Andrade, T. A. Errico, M., Christensen, K. V. (2017). Castor oil transesterification catalysed by liquid enzymes: Feasibility of reuse under various reaction conditions. *Chemical Engineering Transactions* 57, 1-6.

- AOAC (2002). Official Method of Analysis. 16th ed. Washington: Association of Official Analytical.
- AOAC (2005). Official Method of Analysis. 18th ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical.
- APHA, AWWA, WPCF (1992). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales, 17th edition, Madrid: Díaz Santos, pp. 1.2-1.4.
- Araujo, J., Sica, J, Costa, C., Márquez, M.C. (2021). Enzymatic Hydrolysis of Fish Waste as an Alternative to Produce High Value-Added Products. Waste and Biomass Valorization 12,847–855.
- Aspino, S.I., Horn, S.J., Eijsink V.G.H. (2005). Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. Process Biochemistry 40, 1957–66.
- Avelar, M. H. M., Cassimiro, D. M. J., Santos, K. C., Domingues, R. C.C., de Castro, H. F., Mendes A. A. (2013). Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. Industrial Crops and Products 44, 452– 458.
- Aymard, C., Belarbi, A. (2000). Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism. Enzyme and Microbial Technology 27, 612-618.
- Babaei, M., Karimi, A., Hejazi, M.A. (2014). Lipase from *Candida rugosa*. Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly 20, 371-378.
- Baez, A.; Ospina-de-Barreneche, N.; Zapata, J. (2016). Efecto de temperatura, pH, concentración de sustrato y tipo de enzima en la hidrólisis enzimática de vísceras de tilapia roja (*Oreochromis spp.*). Información Tecnológica 27(6), 63-76.
- Bahl, A. (2004). Organic chemistry for competitive examination. New Delhi: S. Chand & Company LTD., pp. 382-383.
- Barros, M., Fleuri, L., Macedo, G. (2010). Seed lipases: sources, applications and properties-a review. Brazilian Journal of Chemical Engineering 27,15-29.
- Barroso V.M. (2013). Análisis de la gestión de residuos de construcción y demolición en la comunidad autónoma de Andalucía. Trabajo fin de carrera. Escuela Superior de Ingenieros de Sevilla. Universidad de Sevilla.

- Bart, J. C. J., Palmeri, N, Cavallaro, S. (2010). Biodiesel Science and Technology. Boca Ratón: CRC Press.
- Batista, I, Ramos, C., Mendonca, R., Nunes, L. (2009). Enzymatic hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) by-products and lipid recovery. Journal of Aquatic Food Product Technology 18, 120-134.
- Bendikienė, V., Juodka, B., Surinaitė, B., Dienys, G. (2008). Lipases in conversion of oils. Experimental screening of enzymes and substrates for biodiesel production. Biologija 54(4), 247–252.
- Beltrán, J.A., Bellés, M. (2019). Effect of Freezing on the Quality of Meat. En: Ferranti, P., Berry, E.M., Anderson, J.R. (eds.) Encyclopedia of Food Security and Sustainability vol. 2, pp. 493-497.
- Bertrán, J., Nuñez J. (2007). Problemas de Química Física. Madrid: Delta Publicaciones Universitarias, pp. 476.
- Bhagavan, N.V. (2002). Three-Dimensional Structure of Proteins. En: Medical Biochemistry (Fourth Edition), London: Academic Press, pp. 51-65.
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., Lalitha, R.G. (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. Bioresource Technology 99, 335–343.
- Bhaskar, N., Modi, V. K., Govindaraju, K., Radha, C., and Lalitha, R. G. (2007). Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. Bioresource Technology 98, 388-394.
- Bianchi, M., Petracci, M., Cavani, C. (2009). The influence of linseed on rabbit meat quality. World Rabbit Science 17, 97 – 107.
- Blanco, A., Blanco, G. (2017). Medical Biochemistry. San Diego: Academic Press.
- Borrelli, G.M., Trono, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. International Journal of Molecular Sciences 16, 20774-20840.
- Boskey, A. (2007). Mineralization of bones and teeth. Elements 3, 385–392.
- Brandelli, A., Sala, L., Kalil, S. J. (2015). Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. Food Research International 73, 3–12.

- Brandt, K., Schembecker, G. (2016). Production rate-dependent key performance indicators for a systematic design of biochemical downstream processes. *Chemical Engineering and Technology* 39, 354–364.
- Briggs, G.E., Haldane, J.B.S. (1925). A Note on the Kinetics of Enzyme Action. *Biochemical Journal* 19(2), 338–339.
- Brígida, A.I., Amaral, P.F., Coelho, M.A., Goncalves, L.R. (2014). Lipase from *Yarrowia lipolytica*: production, characterization and application as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 101, 148–158.
- Buchert, J., Mustranta, A., Holmbom, B. (2002). Enzymatic control of dissolved and colloidal substances during mechanical pulping. *Progress in Biotechnology* 21, 271-280.
- Bustamante, C.A. (2005). Comparación del perfil de ácidos grasos, contenido de grasa y proteína de la carne de búfalo respecto a la carne de vacuno. Trabajo de Grado. Facultad de Zootecnia. Universidad de Bogotá, Colombia.
- Calvo, M. (2019). Bioquímica de los alimentos. [consulta 10 de mayo de 2021]. Disponible en: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/proteins/colageno.html>.
- Camacho, F., Gonzalez-Tello, P., Guadix, E.M., Pardo, F. (1997). Hidrolizados enzimáticos de proteínas para nutrición enteral: Cinética de la hidrólisis. *Acta-A VII*, 81-88.
- Camacho, F. ; Gonzalez-Tello, P.; Paez G.; Marquez, M.C. y Fernandez, V. (1992). Hidrolisis de caseína con Alcalasa. *Ciencia y Tecnología de Alimentos* 33(1), 59-70.
- Canakci, M., Gerpen, J.V. (2001). Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. *Trans ASAE* 44, 1429-1436.
- Castaño-Tostado, E., Domínguez-Domínguez, J. (2010). Diseño de experimentos y análisis en ciencia y tecnología. Querétaro: UAQ.
- Cavalcanti-Oliveira, E., da Silva, P.R., Ramos, A.P., Aranda, D.A.G., Freire, D.M.G. (2011). Study of soybean oil hydrolysis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application to biodiesel production via hydroesterification. *Enzyme Research* 2011, 1-8.
- Chalamaiah, M., Balaswamy, K., Narsing Rao, G., Prabhakara Rao, PG., Jyothirmayi, T. (2011). Chemical composition and functional properties of mrigal

- (*Cirrhinus mrigala*) egg protein concentrates and their application in pasta. *Journal of Food Science and Technology* 50(3), 514-520.
- Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* 11, 254-262.
 - Cortinas, L. (2005). Niveles de ácidos grasos poliinsaturados y α -tocoferol en el pienso de broilers: equilibrio entre composición lipídica y estabilidad oxidativa de la carne. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España.
 - Cox, M. y Nelson, D. (2007). *Principios de bioquímica (Quinta edición)*. Barcelona: Ediciones Omega.
 - Cruz-González, M.I., Sánchez-Machado, D.I., López-Cervantes, J., Munguia-Xochihua, J.A., Molina-Barrios, R.M., Rivera-Acuña, F., Hernández-Chávez, J.F. (2014). Caracterización del perfil de ácidos grasos en carne de borrego de engorda utilizando cromatografía de gases. *Nacameh* 8(1), 39-49.
 - da Silva, J.D., Balmant, W., Soares, D., Corazza, M.L., Krieger, N., Mitchell, D.A. (2017). A combined sorption and kinetic model for multiphasic ethyl esterification of fatty acids from soybean soapstock acid oil catalyzed by a fermented solid with lipase activity in a solvent-free system. *Biochemical Engineering Journal* 120, 84-92.
 - Das, A., Pathak, K., Pathak, M.P., Chattopadhyay, P., Saikia, R., Sahu, S., Gogoi, U. (2020). Enzyme Inhibition. En: Singla, Ch (ed.), *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*. New Delhi: AkiNik Publications, pp. 16.
 - Daza, A., Rey, A.I., Lopez-Carrasco, C., Lopez-Bote, C.J. (2014). Influence of feeding system on growth performance, carcass characteristics and meat and fat quality of Avileña-Negra Ibérica calves' breed. *Spanish Journal of Agricultural Research* 12(2), 409-418.
 - Deng, Y., Butré, C.I., Wierenga, P.A. (2018). Influence of substrate concentration on the extent of protein enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal* 86, 39-48.
 - Dias, M.C.A.F. (2015). *Fat Splitting Using Lipases*. Tesis doctoral. Instituto Superior Técnico de Lisboa, Lisboa, Portugal.
 - Dixon, M., Webb, E. C. (1979). *Enzymes*. 3ª Edición. London: Longman Group Limited, pp. 139-141.

- Doran, P. (2013). Bioprocess Engineering Principles. Academic Press. pp. 630.
- Dumay, J., Allery, M., Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen, P., Carbonneau, M.E., Bergé, J.P. (2009). Optimization of hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) heads with Protamex: enhancement of lipid and phospholipid extraction. Journal of the Science of Food and Agriculture 89(9), 1599 – 1606.
- Elizondo, F., Jiménez, M. (2016). Método de reducción de muestra para ensayos de laboratorio en mezcla asfáltica en caliente. Métodos y Materiales 4(1), 11-16.
- Esquivelzeta, C., Casellas, J., Fina, M., Campo, M.M., Piedrafita, J. (2017). Carcass traits and meat fatty acid composition in Mediterranean light lambs. Canadian Journal of Animal Science 97, 734–741.
- Eurostat (2020). Generación de residuos municipales. [consulta: 10 de octubre 2020]. Disponible en: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/images/thumb/e/e8/Municipal_waste_generated%2C_2005_and_2019_%28kg_per_capita%29.png/800px-Municipal_waste_generated%2C_2005_and_2019_%28kg_per_capita%29.png.
- Fabiano, B. Pergo, P. (2002). Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. International Journal of Hydrogen Energy 27, 149-156.
- Fallah, M. Bahram, S., Javadian, S.R. (2015). Fish peptone development using enzymatic hydrolysis of silver carp by-products as a nitrogen source in *Staphylococcus aureus* media. Food Science and Nutrition 3(2),153-157.
- FAO (2021). Codex Alimentarius. [consulta: 14-07-2021]. Disponible en: http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_composition.html.
- FAOSTAT (2017). Consumo per-cápita mundial de carnes. [consulta: 14-07-2021]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es>.
- FAOSTAT (2018). Producción mundial de carne. [consulta: 14-07-2021]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es>.
- Ferreira, A., Duarte, J., Neto, A.J., Fiorentini, G, Berchielli, T.T. (2016). Fatty acid profile, meat quality, and carcass traits of Nellore young bulls fed different sources of forage in high-concentrate diets with crude glycerin. Revista Brasileira de Zootecnia 45(4),165-173.

- Figueroa, O.A., Zapata, J.E., Gutiérrez, G.A. (2012). Modelamiento de la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas del plasma bovino. *Revista Escuela de Ingeniería de Antioquia* 17, 71-84.
- Fontoura, R., Daroit, D. J., Correa, A. P. F., Meira, S. M. M., Mosquera, M., & Brandelli, A. (2014). Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme- and dipeptidyl peptidase-IV-inhibitory activities. *New Biotechnology* 31, 506-513.
- Fountoulakis, M, Lahm, H.-W. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A* 826, 109–134.
- Fundación para la Economía Circular (2020). Diagnóstico y escenarios del cumplimiento de los objetivos de residuos municipales 2025-2030-2035. Madrid: Fundación para la Economía Circular, pp. 31
- García, A.J., Esteban, M.B., Márquez, M.C., Ramos, P. (2005). Biodegradable municipal solid waste: Characterization and potential use as animal feedstuffs. *Waste Management* 25, 780–787.
- García, M. (2005). Hidrólisis enzimática de triglicéridos en emulsiones O/W. Aplicación a la formulación de detergentes. Tesis doctoral. Universidad de Granada, Granada, España.
- Geirsdottir, M. S., Sigurgisladottir, S., Hamaguchi, P. Y., Thorkelsson, G., Johannsson, R., Kristinsson, H. G., & Kristjansson, M.M. (2011). Enzymatic hydrolysis of Blue whiting (*Micromesistius poutassou*); functional and bioactive properties. *Journal of Food Science* 76(1), C14-C20.
- Gomes, N., Braga, A., Teixeira, J.A., Belo, I. (2013). Impact of lipase mediated hydrolysis of castor oil on ϵ -decalactone production by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of American Oil Chemistry Society* 90,1131-1137.
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatine from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids* 25, 1813-1827.
- Goswami, D., De, S., Basu, J. K. (2012). Effects of process variables and additives on mustard oil hydrolysis by porcine pancreas lipase. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 29(3), 449-460.
- Gousterova, A., Braikova, D., Goshev, I., Christov, P., Tishinov, K., Vasileva-Tonkova, E., et al. (2005). Degradation of keratin and collagen containing wastes

by newly isolated Thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis. Letters in Applied Microbiology 40, 335-340.

- Guadix, A.; Guadix, E. M.; Páez-Dueñas, M. P.; González-Tello, P. y Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica* 41 (1), 79-89.
- Guérard, F., Dufossé, L., De La Broise, D., Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11, 1051–1059.
- Gunaratne, J.T.K. (1999). Performance of three commercial lipases in a model enzyme modified cheese system. Tesis doctoral. Universidad de Massey, Auckland, Nueva Zelanda, pp. 122-123.
- Gupta, P., Upadhyay, L., Shrivastava, R. (2011). Lipase catalyzed transesterification of vegetable oils by lipolytic bacteria. *Research Journal of Microbiology* 6, 281-288.
- Gutiérrez, H, de la Vara, R. (2008). Análisis y diseño de experimentos. México D.F.: McGraw-Hill.
- Hamden, K., Keskes, H., Elgomdi, O., Feki, A., Alouche, N. (2017). Modulatory effect of an isolated triglyceride from fenugreek seed oil on α -amylase, lipase and ace activities, liver-kidney functions and metabolic disorders of diabetic rats. *Journal of Oleo Science* 66: 633-645.
- Hartina, M.R.U., Kuan, A.Y.P., Wolyna, P., Lee, J.S., Izzreen, M.N. (2017). Effects of different enzymatic treatment on the properties of hydrolyzed collagen from pangasius fish (*Pangasius hypophthalmus*). *Proceedings of International Conference on Food Science and Nutrition 2017*, 173-178.
- Hathwar, S.C., Bijinu, B., Rai, A.K., Narayan, B. (2006). Simultaneous recovery of lipids and proteins by enzymatic hydrolysis of fish industry waste using different commercial proteases. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164, 115–124.
- Hema, G. S., Joshy, C. G., Shyni, K., Chatterjee, N.S., Ninan, G. (2017). Optimization of process parameters for the production of collagen peptides from fish skin (*Epinephelus malabaricus*) using response surface methodology and its characterization. *Journal of Food Science and Technology* 54(2), 488–496.

- Henley, J. P., Sadana, A. (1985). Deactivation Theory. *Biotechnology and Bioenergy* XXVIII, 1277-1285.
- Hernández, A.B., Guillon, M.P., García, L.A. (2015). La metodología de Taguchi en el control estadístico de la calidad. *Investigación Operativa* XXIII(37), 65-83.
- Herpandi, H., Rosma, A., Nadiah W.A.W., Febrianto, N.A., Huda, N. (2017). Optimization of enzymatic hydrolysis of skipjack tuna by-product using Protamex®: A response surface approach. *Journal of Fundamental and Applied Sciences* 9(2S), 845-860.
- Himonides, A.T., Taylor, A.K., Morris, A.J. (2011). Enzymatic hydrolysis of fish frames using pilot plant scale systems. *Food Nutrition Science* 2, 586–593.
- Hoornweg, D, Bhada-Tata, P. Kennedy, C. (2013). Environment: Waste production must peak this century. *Nature* 502, 615-617,
- Horner, N.R., Grenville-Briggs, L.J., Van West, P. (2012). The oomycete *Pythium oligandrum* expresses putative effectors during mycoparasitism of *Phytophthora infestans* and is amenable to transformation. *Fungal Biology* 116,24-41.
- Huang, S., Liu, P. (2010). Inhibition of angiotensin I-converting enzymes by enzymatic hydrolysates from chicken blood. *Journal of Food and Drug Analysis* 18, 458-463.
- Illanes, A., Altamirano, C. (2008). Enzyme reactors. En: Illanes, A. (ed.), *Enzyme Biocatalysis. Principles and Applications*. Netherlands: Springer, pp. 224-249.
- Iltchenko, M., Kempka, A.P., Prestes, R.C. (2017). Profiles of enzymatic hydrolysis of different collagens and derivatives over time. *Revista brasileira de Tecnología Agroindustrial* 11(1), 2165-2185.
- Jaeger, K.-E., Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 13,390-397.
- Jamie, A., Alshami, A.S., Maliabari, Z. O., Ateih, M.A. (2017). Development and validation of a kinetic model for enzymatic hydrolysis using *Candida rugosa* lipase. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques* 7, 297-303.
- Jamil, N.H., Halim, N.R.A., Sarbon, N.M. (2016). Optimization of enzymatic hydrolysis condition and functional properties of eel (*Monopterus* sp.) protein using response surface methodology (RSM). *International Food Research Journal* 23(1), 1-9.

- Ji, Y., Zhang, G., Zhang, Y. (2016). Optimization of enzymatic hydrolysis of protein from small yellow croaker (*Pseudosciaena polyactis*) using response surface methodology. *Advance Journal of Food Science and Technology* 11(1), 1-6.
- Johnson, K.A., Gody, R.S. (2011). The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry* 50(39), 8264–8269.
- Johnson, W. Jr. (2001). Cosmetic Ingredient Review Expert Panel. Final report of the safety assessment of triarachidin, tribehenin, tri-caprin, trierucin, triheptanoin, triheptylundecanoin, triisono-nanoin, triisopalmitin, triisostearin, trilinolein, trimyristin, trioctanoin, triolein, tripalmitin, tripalmitolein, tricinolein, tristearin, triundecanoin, glyceryl triacetyl hydroxystearate, glyceryl triacetyl ricinoleate, and glyceryl stearate diacetate. *International Journal of Toxicology* 20(4), 61-94.
- Junta de Castilla y León (2000-2019). *Informes de Sostenibilidad Ambiental 2000-2019: Indicadores Ambientales y de Sostenibilidad*. Valladolid: Junta de Castilla y León.
- Kanmani, P., Kumaresan, K., Aravind, J. (2015). Pretreatment of coconut mill effluent using celite-immobilized hydrolytic enzyme preparation from *Staphylococcus pasteurii* and its impact on anaerobic digestion. *Biotechnology Progress* 31,1249-1258.
- Kapoor, M., Gupta, M.N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry* 47, 555-569.
- Kaza, S., Yao, L., Bhada-Tata, P., van Woerden, F. (2018). *What a Waste: 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050*. Washington: The World Bank Group. pp. 18-33.
- Kechaou, E., Dumay, J., Donnay, C., Jaouen, P.I., Gouygou, J.P., Bergé, J.P., Amar, R.B. (2009). Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107 (2), 158–164.
- Kenneth, F. K., Kriemhild, C. (2001). *The Cambridge world history of food*. Ed. Cambridge: Cambridge University Press.

- Kiss, A. A., Grievink, J., & Rito-Palomares, M. (2015). A systems engineering perspective on process integration in industrial biotechnology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 90, 349–355.
- Kittikun, A.H., Bourneow, Ch., Benjakul, S. (2012). Hydrolysis of surimi wastewater for production of transglutaminase by *Enterobacter* sp. C2361 and *Providencia* sp. C1112. *Food Chemistry* 135, 1183–1191.
- Kobayashi, T., Nagao, T., Watanabe, Y., Shimada, Y. (2021). Promotion of the lipase-catalysed hydrolysis of conjugated linoleic acid l-methyl ester by addition of an organic solvent. *SpringerPlus* 1(1), 67-71.
- Kristinsson, H, Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40(1), 43–81.
- Kumar, S., Negi, S. (2015). Transformation of waste cooking oil into C-18 fatty acids using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* through solid state fermentation. *3 Biotech* 5,847-851.
- Kumar, V., Jahan, F., Mahajan, R.V., Saxena, R.K. (2016). Efficient regioselective acylation of quercetin using *Rhizopus oryzae* lipase and its potential as antioxidant. *Bioresource Technology* 218, 1246-1248.
- Kurozawa, L.E., Park, K.J., Hubinger, M.D. (2008). Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using Response Surface Methodology. *Food Chemistry* 73(5), C405-C412.
- Laachari, F., El Bergadi, F., Sayari, A., Elabed, S., Mohammed, I., Harchali, E.H., Ibsouda, S.K. (2015). Biochemical characterization of a new thermostable lipase from *Bacillus pumilus* strain. *Turkish Journal of Biochemistry* 40:8-14.
- Ladeira, M.M., Santarosa, L.C., Chizzotti, M.L., Ramos, E.M., Machado, O.R. Oliveira, D.M., Carvalho, J.R.R., Lopes, L.S. Ribeiro, J.S. (2014). Fatty acid profile, color and lipid oxidation of meat from young bulls fed ground soybean or rumen protected fat with or without monensin. *Meat Science* 96, 597–605.
- Lampi, A.-M., Damerou, A., Li, J., Moisio, T., Partanen, R., Forssell, P., Piironen. V. (2015). Changes in lipids and volatile compounds of oat flours and extrudates during processing and storage. *Journal of Cereal Science* 62,102-109.

- Lante, A., Tinello, F., Lomolino, G. (2013). Effect of UV light on microbial proteases: From enzyme inactivation to antioxidant mitigation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 17, 130-134.
- Lasekan, A., Bakar, A., & Hashim, D. (2013). Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. *Waste Management* 33, 552-565.
- Laskar, A., Chatterjee, A. (2009). Protease –Revisiting the Types and potential. *Online Journal of Biotechnology Research* 1(1), 55-61.
- Leduc, A., Fournier, V., Henry, J. (2020). A standardized, innovative method to characterize the structure of aquatic protein hydrolysates. *Heliyon* 6, 6.
- Lencki, R.W., Smink, N., Snelling, H., Arul, J. (1998). Increasing short-chain fatty acid yield during lipase hydrolysis of a butterfat fraction with periodic aqueous extraction. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75(9), 1195-1200.
- León, A., Morales, A., Martínez, V.M., Vargas, A., Zeugolis, D.I., Aguirre, G. (2019). Hydrolyzed Collagen—Sources and Applications. *Molecules* 24, 4031-4047.
- Li, S., Yu, Q. (2019). Extraction and characterization of collagens from yak rumen smooth muscle. *Animal Science Journal* 90, 1581–1589.
- Lide, D. R. (ed.) (2005). *Handbook of Chemistry and Physics*. 101^a edición. Cleveland: CRC, pp. 6.3.
- Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M., Sergent, M., Phan-Tan-Luu, R. (1995). Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science* 60 (5), 949-958.
- Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M., Sergent, M., Phan-Tan-Luu, R. (2006). Protein Recovery from Veal Bones by Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Food Science* 60(5), 949-952.
- Litantra, R., Yim, J.H. (2013). Expression and biochemical characterization of cold-adapted lipases from Antarctic *Bacillus pumilus* strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 23,1221-1228.
- Lodeiro, A. (2016). *Catálisis enzimática: Fundamentos químicos de la vida*. La Plata: Universidad Nacional de La Plata.
- López, J.M., García, F. (2015). Los cuatro mosqueteros de la cinética enzimática. *Eubacteria* 34, 39-43.

- Lu, J., Dong, Y., Ng, E.C., Siehl, D.L. (2017). Novel form of the Michaelis–Menten equation that enables accurate estimation of $(k_{cat}/K_M) \cdot K_I$ with just two rate measurements; utility in directed evolution. *Protein Engineering, Design & Selection* 30(5), 395–399.
- Malcata, F.X., Hill, Jr, C.G., Amundson, C.H. (1992). Hydrolysis of butteroil by immobilised lipase using a hollow-fibre reactor. Part III. *Biotechnology and Bioengineering* 39, 1002-1012.
- Maluf, J.U., Fiorese, M.L., Maestre, K.L., Dos Passos, F.R., Finkler, J.K., Fleck, J.F., Borba, C.E. (2020). Optimization of the porcine liver enzymatic hydrolysis conditions. *Journal of Food Process Engineering* 43(2), 1-12.
- Manhiani, P. S., Northcutt, J. K., Han, I., Bridges, W. C., & Dawson, P. L. (2013). Antioxidant activity of carnosine extracted from various poultry tissues. *Poultry Science* 92, 444-453.
- Manninen, A. H. (2009). Protein hydrolysates in sports nutrition. *Nutrition & Metabolism* 6, 38.
- Marcello, J.A. (2016). Animal Fat Composition and Modification. En: Sanders, T.A.B. (ed). *Functional Dietary Lipids: Food Formulation, Consumer Issues and Innovation for Health*. Oxford: Woodhead Publishing, pp. 47-67.
- Martínez, C. M., García, Y. (2016). Utilización de pretratamientos básicos y específicos para la producción de biogás. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias* 81-92.
- Martínez-Álvarez, O., Chamorro, S., Brenes, A. (2015). Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food Research International* 73, 204-212.
- Martínez-Corona, R., Cortes-Penagos, C., Madrigal-Pérez, L.A., González-Hernández, J.C. (2019). Hongos y levaduras: Fábricas de lipasas. *Interciencia* 44(7), 378-385.
- Meng, Z., Wei, S., Qi, K., Guo, Y., Wang, Y., Liu, Y. (2018). Secondary structure of proteins on oil release in aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil as affected hydrolysis state. *International Journal of Food Properties* 21(1), 119–127.
- Michaelis, L., Menten, M.L. (1913). Die kinetik der invertunwirkung. *Biochemische Zeitschrift* 49, 333-369.

- Minh, N. P., Dao, D. T. A. (2014). Optimization of proteolytic hydrolysis from raw lean pork meat by enzymatic method to produce functional powder. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development* 1(2), 56-65.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (2012-2017). *Perfiles ambientales de España 2011-2016*. Centro de publicaciones. Secretaría Técnica. Madrid.
- Ministerio de Medioambiente (2003-2007). *Perfiles ambientales de España 2002-2006*. Centro de publicaciones. Secretaría Técnica. Madrid.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (2008-2011). *Perfiles ambientales de España 2007-2010*. Centro de publicaciones. Secretaría Técnica. Madrid.
- Ministerio para la Transición Ecológica (2018-2019). *Perfiles ambientales de España 2017-2018*. Centro de publicaciones. Secretaría Técnica. Madrid.
- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (2020). *Perfil ambiental de España 2019*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino Centro de publicaciones. Secretaría Técnica. Madrid.
- Mohammad, A.W., Kumar, A.G., Basha, R.K. (2015). Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia (*Oreochromis Spp.*) scale gelatine. *International Aquatic Research* 7, 27-39.
- Monje, R; Campos, H. (2006). *Tabla de composición de alimentos de Costa Rica: Ácidos grasos*. San José: Sepan.
- Montgomery, D.C. (2019). *Design and Analysis of Experiments*, 10ª edición. New York: Wiley.
- Montoya, C., García. J.F., Barahona, R. (2015). Contenido de ácidos grasos en carne de bovinos cebados en diferentes sistemas de producción en el trópico colombiano. *Vitae* 22(3), 205-214.
- Moo-Huchin, V., Chi-Kuk, M., Sauri-Duch, E., Moo-Huchin, M., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R. (2013). Composición de ácidos grasos de la carne de ovinos de pelo. XL Reunión de la Asociación Mexicana para la Producción Animal y Seguridad Alimentaria, A.C. (AMPA) y IX Seminario Internacional de Ovinos en el Trópico, 875-878.
- Mora, L., Reig, M., Toldrá, F. (2014). Bioactive peptides generated from meat industry by-products. *Food Research International* 65, 344-349.

- Morales-Medina, R., Munio, M., Guadix, A., Guadix, E.M., Camacho, F. (2018). A lumped model of the lipase catalyzed hydrolysis of sardine oil to maximize polyunsaturated fatty acids content in acylglycerols. *Food Chemistry* 240, 286-294.
- Moreau, R.A., Harron, A.F., Powell, M.J., Hoyt, J.L. (2016). A comparison of the levels of oil, carotenoids, and lipolytic enzyme activities in modern lines and hybrids of grain sorghum. *Journal of American Oil Chemistry Society* 93, 569-573.
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L., Cuadrado, C. (2018). *Tablas de composición de alimentos*. 19ª edición. Madrid: Pirámide.
- Moreno-Pirajan, J., Giraldo, L. (2011). Study of immobilized candida rugosa lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. *Arabian Journal of Chemistry* 4, 55-62.
- Mozurkewich, M., Benson, S. W. (1984). Negative activation energies and curved arrhenius plots. 1. Theory of reactions over potential wells. *The Journal of Physical Chemistry* 88(25), 6429-6435.
- Muchenje, V., Dzama, K., Chimonyo, M., Strydom, P.E., Hugo, A., Raats, J.G. (2009). Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: A review. *Food Chemistry* 112, 279–289.
- Muench, J. L., Kruuv, J., Lepock, J. R. (1996). A Two-Step Reversible–Irreversible Model Can Account for a Negative Activation Energy in an Arrhenius Plot. *Cryobiology* 33(2), 253-259.
- Mukataka, S., Kobayashi, T., Sato, S., Takahashi, J. (1987). Enzymatic hydrolysis at high substrate concentrations in biphasic organic-aqueous systems. *Journal of Fermentation Technology* 65(1), 23-29.
- Mullally, M. M., O’Callaghan, D. M., FitzGerald, R. J., Donnelly, W. J., Dalton, J. P. (1994): Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatic protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolysate characteristics. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 42, 2973-2981.
- Naqash, S.Y., Nazeer, R.A. (2013). Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from pink perch (*Nemipterus japonicus*) muscle. *Journal of Food Science and Technology* 50(5), 972-978.

- Nchienzia, H.A., Morawicki, R.O., Gadang, V.P. (2010). Enzymatic hydrolysis of poultry meal with endo- and exopeptidases. *Poultry Science* 89(10), 2273-80.
- Nielsen, S.S. (2003). *Análisis de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, S.A., pp. 275-276.
- Nollet, L.M.L., Toldra, F. (2008). *Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis*. Boca Ratón: CRC Press, pp. 209.
- Norman, A., Xu, Y., AL-Bukhaiti, Q., Abed, S.M., Ali, A.H., Ramadhan, A.H., Xia, W. (2018). Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. *Process Biochemistry* 67, 19-28.
- Novo Industrias (2001). Determination of neutrase using the Anson Hemoglobin Method. Analytical Method. EB-SM-0348.01/01.
- Novozymes (2002): Alcalase, 2001-08281-02, Novozymes A/S, Bagsuaerd, Denmark.
- Novozymes (2003): Flavourzyme 1000L, Product Data Sheet, Novozymes A/S, Bagsuaerd, Denmark.
- Novozymes (2008): Alcalase, 2008-15062, Novozymes Switzerland AG, Neumatt, Denmark.
- Novozymes (2015): Flavourzyme 1000L, Product Data Sheet, Novozymes A/S, Bagsuaerd, Denmark.
- Novozymes (2020a). Lipases for Biocatalysis for smarter chemical synthesis. [consulta: 05-11-2020]. Disponible en: https://www.novozymes.com/-/media/Project/Novozymes/Website/website/document-library/Advance-your-business/Pharma/Biocatalysis_brochure_Lipases.pdf.
- Novozymes (2020b). Novozyme Lipase products. [consulta: 05-11-2020]. Disponible en: https://www.strem.com/uploads/technical_notes/06-3135tech.pdf.
- Novozymes (2020c). Enzymes for biocatalysis. [consulta: 05-11-2020]. Disponible en: https://www.strem.com/uploads/resources/documents/novozymes_enzymes_for_biocatalysis_copy1.pdf.

- Ogonda, L.A., Muge, E.K., Mbatia, B., Mulaa, F.J. (2017). Optimization of Alcalase hydrolysis conditions for production of dagaa (*Rastrineobola argentea*) hydrolysate with antioxidative properties. *Industrial Chemistry* 3, 122-128.
- Ollero, P. (2020). *Fundamento de las operaciones de separación de transferencia de materia*. Sevilla: Editorial Universidad de Sevilla.
- O'Meara, G.M., Munro, P.A. (1985). Kinetics of the hydrolysis of lean meat protein by Alcalase: Derivation of two alternative rate equations and their fit to experimental data. *Biotechnology and Bioengineering* 27, 861-869.
- Ovalles, G.A. (2011). Uso de la metodología de superficies de respuesta en la optimización de procesos. *Ecomatemático* 2(1), 16-20.
- OWID (2021). Atlas mundial de la carne 2021. [consulta: 14-07-2021]. Disponible en: <https://www.dw.com/es/atlas-mundial-de-la-carne-2021-es-hora-de-repensar-lo-que-comemos/a-56147259>.
- Pacheco-Aguilar, R., Angel, M., Manzano, M., & Ramire-Suarez, J. C. (2008). Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chemistry* 109(4), 782-789.
- Pagura, J., Puigsubirá, C., Casali, A., Borra, V. (2009). Alternativas para el análisis de resultados de diseños robustos. *Revista FABICIB* 13, 75-87.
- Pahoja V.M., Sethar, M.A. (2002). A review of enzymatic properties of lipase in plants, animals and microorganisms. *Pakistan Journal of Applied Sciences* 2, 474-484.
- Palmer, T., Bonner, P.L.R. (2014). Enzyme Inhibition. En: Palmer, T., Bonner, P.L.R. (eds.), *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry*, 2ª edición. Oxford: Woodhead Publishing Limited, pp. 126-152.
- Pasupuleti, V. K., Holmes, Ch., Demain, A. L. (2014). Applications of protein hydrolysates in Biotechnology. En: Pasupuleti, V. K., Demain, A. L. (eds.), *Protein Hydrolysates in Biotechnology*. New York: Springer Science & Business Media, pp. 1-9.
- Patil, K.J., Chopda, M.Z., Mahajan, R.T. (2011). Lipase biodiversity. *Indian Journal of Science & Technology* 4, 971-982.
- Pearson, A. M., Young, R. B. (1989) *Muscle and meat biochemistry*. London: Academic Press Limited, pp. 342- 362.

- Peinado, I.; Larrea, V.; Heredia, AB.; Andrés, AM. (2018). Lipolysis kinetics of milk-fat catalyzed by an enzymatic supplement under simulated gastrointestinal conditions. *Food Bioscience* 23, 1-8.
- Perdana, J., Fox, M.B., Schutyser, M.A.I., Boom, R.M. (2012). Enzyme inactivation kinetics: Coupled effects of temperature and moisture content. *Food Chemistry* 133, 116–123.
- Pérez-Won, M, Lemus-Mondaca, R., Herrera-Lavados, C., Reyes, J.E., Roco, T., Palma-Acevedo, A., Tabilo-Munizaga, G., Aubourg, S.P. (2020). Combined Treatments of High Hydrostatic Pressure and CO₂ in Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Effects on Enzyme Inactivation, Physicochemical Properties, and Microbial Shelf Life. *Foods* 9, 273-288.
- Perry (2019). *Perry's chemical engineer's handbook*. 9^a ed. Nueva York: McGraw-Hill Education.
- Polakovič, M., Vrábel, P., Bálaš, V. (1998). Approaches for improved identification of mechanisms of enzyme inactivation. *Progress in Biotechnology* 15, 77-82.
- Primožič, M., Habulin, M., Knez, Z. (2003). Parameter Optimization for the Enzymatic Hydrolysis of Sunflower Oil in High-Pressure Reactors. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80(7), 643-646.
- Real, M. (2018). Caracterización en ácidos grasos de la carne de corderos del Partido de Puan (Buenos Aires, Argentina). *Revista Veterinaria Argentina* XXXV(361), 1-10.
- Rekharsky, M. V., Egorov, A. M., Gal'chenko, J. L. (1987). Thermochemistry of hydrolytic enzymatic reactions. *Thermochimica Acta* 112, 151-160.
- Rodríguez, J. A., Maldonado, J. M., Muro, M.A., Miranda, L.G. (2016). Índice de saponificación de cinco mantecas determinado mediante un micrométodo. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos* 1(1), 937-942.
- Rogers, H.J., Weidmann, S.M., Parkinson, A. (1952). Studies on the skeletal tissues. II. The collagen content of bones from rabbits, oxen and humans. *Biochemical Journal* 50(4), 537-542.
- Ruan, Ch.-Q., Chi, Y.-J., Zhang, R.-D. (2010). Kinetics of Hydrolysis of Egg White Protein by Pepsin. *Czech Journal of Food Science* 28(5), 355–363.

- Rusli, S., Grabowski, J., Drews, A., Kraume, M. (2020). A Multi-Scale Approach to Modeling the Interfacial Reaction Kinetics of Lipases with Emphasis on Enzyme Adsorption at Water-Oil Interfaces. *Processes* 8, 1082-2022.
- Qi-Yuan, L., Jun-Qing, Q., Xiao-Ge, W. (2016). Optimization of enzymatic fish oil extraction from mackerel viscera by response surface methodology. *International Food Research Journal* 23(3), 992-997.
- Qian, J., Zhang, H., Liao, Q. (2011). The properties and kinetics of enzymatic reaction in the process of the enzymatic extraction of fish oil. *Journal of Food Science and Technology* 48(3), 280-284.
- Ramnath, L., Sithole, B., Govinden, R. (2017). Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry. *Canadian Journal of Microbiology* 63, 179-192.
- Rashid, F.A.A., Rahim, R.A., Ibrahim, D., Balan, A., Bakar, N.M.A. (2013). Purification and properties of thermostable lipase from a Thermophilic bacterium, *Bacillus licheniformis* IBRL-CHS2. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 7, 1635-1645.
- Rasimi, N.A.S.M., Ishak, N.H., Mannur, I.S., Sarbon, N.M. (2020). Optimization of enzymatic hydrolysis condition of snakehead (*Channa striata*) protein hydrolysate based on yield and antioxidant activity. *Food Research* 4 (6), 2197 – 2206.
- Rodríguez-Díaz, J.C., Kurozawa, L.E., Netto, F.M, Hubinger, M.D. (2011). Optimization of the enzymatic hydrolysis of blue shark skin. *Journal of Food Science* 76(7), C938-C949.
- Rojas, M.L., Trevilin, J.H., Duarte, P.E. (2016). The ultrasound technology for modifying enzyme activity. *Scientia Agropecuaria* 7(2), 145-150.
- Rojas, C., Tripaldi, P., Pérez, A., Quinteros, P. (2012). Diseño experimental y métodos de decisión multicriterio para optimizar la composición del helado mantecado. *Scientia Agropecuaria* 1, 51 – 60.
- Roslan, J., Kamal, M. S. M., Yunos, M. K. F., Abdullah, N. (2015). Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia (*Oreochromis Niloticus*) byproduct using response surface methodology. *International Food Research Journal* 22(3), 1117–1123.

- Safari, R, Motamedzadegan, A. (2012). Use of Hydrolysates from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Heads as a Complex Nitrogen Source for Lactic Acid Bacteria. *Food Bioprocess Technology* 5, 73–79.
- Saiga, A., Iwai, K., Hayakawa, T., Takahata, Y., Kitamura, S., Nishimura, T., Morimatsu, F. (2008). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9586-9591.
- Salaberría, F., Palla, C., Carrín, M.E. (2017). Hydrolytic activity of castor bean powder: effect of gum arabic, lipase and oil concentrations. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 94,741-745.
- Sampedro, L.J.G., Grimaldos, N.A.G., Pereañez, J.A., Montoya, J.E.Z. (2019). Lipids as competitive inhibitors of Subtilisin Carlsberg in the enzymatic hydrolysis of proteins in red tilapia (*Oreochromis* sp.) viscera: Insights from kinetic models and a molecular docking study. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 36(2), 647 – 655.
- Sande, D., Souza, L.T.A., Oliveira, J.S., Santoro, M.M., Lacerda, I.C.A., Colen, G., Takahashi, J.A. (2015). *Colletotrichum gloeosporioides* lipase: characterization and use in hydrolysis and esterifications. *African Journal of Microbiology Research* 9,1322-1330.
- Santos, L.D., Coutinho, J.A., Ventura, S.P. (2015). From water-in-oil to oil-in-water emulsions to optimize the production of fatty acids using ionic liquids in micellar systems. *Biotechnology Progress* 31, 1473-1480.
- Ścibisz, M., Arct, J., Pytkowska, K. (2008). Protein hydrolysates in cosmetics production, part II. *SÖFW J Wydanie Polskie* 4, 12–9.
- Seth, S., Chakravorty, D., Dubey, V.K., Patra, S. (2014). An insight into plant lipase research—challenges encountered. *Protein Expression & Purification* 95, 13-21.
- Shaeiwitz, J. A., Henry, J. D., Ghosh, R. (2000). Bioseparation. En *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Sharma, A., Chaurasia, S.P., Dalai, A.K. (2013). Enzymatic hydrolysis of cod liver oil for the fatty acids production. *Catalysis Today* 207, 93– 100.
- Shukla, A.K. (2014). Biodiversity in *Aspergillus nidulans* group on the basis of lipases profile. *International Journal of Science and Research* 3, 1391-1394.

- Sifuentes-Penagos, G.; León-Vásquez, S.; Castillo, A. (2018). Hidrólisis de las proteínas de anchoveta (*Engraulis ringens*) entera por acción de la enzima Protamex. *Scientia Agropecuaria* 9(1), 93-102.
- Silva, V.M., Park, K.J., Hubinger, M.D. (2010). Optimization of the Enzymatic Hydrolysis of Mussel Meat. *Journal of Food Science* 75(1), C36-C42.
- Sionkowska, A., Skrzyński, S., Śmiechowski, K., Kołodziejczak, A. (2017). The review of versatile application of collagen. *Polymers for Advanced Technology* 28(1), 4-9.
- Song, S., Li, S., Fan, L., Hayat, K., Xiao, Z., Chen, L., Tang, Q. (2016). A novel method for beef bone protein extraction by lipase-pretreatment and its application in the Maillard reaction. *Food Chemistry* 208, 81–88.
- Sosa, A.R., Montero, Maribel, Juárez, F. (2009). Contenido de ácidos grasos y conjugados del ácido linoleico en carne de bovinos. *Revista electrónica de Veterinaria*. 10(10), 1-84.
- Stiborova, H., Kronusova, O., Kastanek, P., Brazdova, L., Lovecka, P., Jiru, M., Belkova, B., Poustka, J., Stranska, M., Hajslova, J., Demnerova, K. (2020). Waste products from the poultry industry: A source of high-value dietary supplements. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 95, 985–992.
- Strelow, J., Dewe, W., Iversen, P.W., Brooks, H.B., Radding, J. A., McGee, J., Weidner, J. (2021). Mechanism of Action Assays for Enzymes. En: Markossian, M., Grossman, A., Brimacombe, K. (eds.), *Assay Guidance Manual*. Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, pp. 105-106.
- Strzelczyk, P., Bujacz, G.D., Kiełbasiński, P., Błaszczak, J. (2016). Crystal and molecular structure of hexagonal form of lipase B from *Candida antarctica*. *Acta Biochimica Polonica* 63,103-109.
- Sumaya-Martínez, T., Castillo-Morales, A., Favela-Torres, E., Huerta-Ochoa, S., Prado-Barragán, L. A. (2005). Fish protein hydrolysates from gold carp (*Carassius auratus*): I. A study of hydrolysis parameters using response surface methodology. *Journal of Science and Food Agriculture* 85, 98-104.
- Taguchi, G., Chowdhury, S, Wu, Y. (2005). *Taguchi Quality Engineering Handbook*. New York: John Wiley & Sons.

- Taheri, A. Kenari, A.A., Motamedzadegan, A., Habibi-Rezaei, M. (2011). Poultry by-products and enzymatic hydrolysis: optimization by response surface methodology using Alcalase® 2.4L. *International Journal of Food Engineering* 7(5), Article 1.
- Teng, D., Le, R., Yuan, F., Yang, J., He, L., Gao, Y. (2009). Optimization of Enzymatic Hydrolysis of chicken fat in emulsion by Response Surface Methodology. *Journal of American Oil Society* 86, 485-494.
- Timberlake, K. (2013). *Química general, orgánica y biológica: estructuras de la vida*. México: Pearson Educación.
- Tsai, Sh.-W., Chiang, Ch.-L. (1991). Kinetics, Mechanism, and Time Course Analysis of Lipase-Catalyzed Hydrolysis of High Concentration Olive Oil in AOT-Isooctane Reversed Micelles. *Biotechnology and Bioengineering* 38, 206-211.
- Valencia, P., Pinto, M., Almonacid, S. (2014). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry* 49, 258–264.
- Vallino, J. J., & Stephanopoulos, G. (1990). *Frontiers in bioprocessing*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Van Loon, L.J.C. (2007). Application of protein or protein hydrolysates to improve postexercise recovery. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 17, 104-117.
- Varelis, P., Melton, L., Shahidi, F. (2019). *Encyclopedia of Food Chemistry*, vol.1. New York: Elsevier, pp. 383.
- Veselá, M., and Friedrich, J. (2009). Amino acid and soluble protein cocktail from waste keratin hydrolysed by a fungal keratinase of *Paecilomyces marquandii*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 14, 84-90.
- Virto, M.D., Agudt, I., Montero, S., Blanco, A., Solozabalt, R., Lascaray, J.M., Llamas, M.J., Serra, J.L., Landetat, L.C., Renobales, M. (1994). Hydrolysis of animal fats by immobilized *Candida rugosa* lipase. *Enzyme and Microbial Technology* 16, 61-65.
- Walas, S. M. (1990): *Chemical Process Equipment. Selection and Design*. Washington: Butterworth-Heinemann.

- Walsh, R.P. (2012). Alternative Perspectives of Enzyme Kinetic Modeling. En: Ekinci, D. (ed) Medicinal Chemistry and Drug Design. London: IntechOpen.
- Wang, D., Zhang, M., Zou, Y., Sun, X.Z., Xu, W. (2018). Optimization of Flavourzyme hydrolysis condition for the preparation of antioxidant peptides from duck meat using response surface methodology. *Journal of Poultry Science* 55(3), 217-223.
- Wu, W., Long, M. R., Zhang, X., Reed, J. L., Maravelias, Ch. T. (2018). A framework for the identification of promising bio- based chemicals. *Biotechnology and Bioengineering* 115:2328–2340.
- Xiao, Z., Hou, X., Lyu, X., Zhao, J.-Y., Xi, L., Li, J., Lu, J.R. (2015). Enzymatic synthesis of aroma acetoin fatty acid esters by immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Biotechnology Letters* 37, 1671-1677.
- Xie, W., Khosasih, V., Suwanto, A., Kim, H.K. (2012). Characterization of lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from human facial sebaceous skin. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22,84-91.
- Yang, Q.-W., Zhen, Ch., Chen, S., Zhang, Y., Shen, W., Chen, S.-S., Huang, G.-R. (2015). Optimization of enzymatic hydrolysis for producing ferrous binding peptides from horse mackerel (*Trachurus japonicus*) processing byproducts. *Biotechnology* 14 (5), 254-259.
- Young, M.F. (2003). Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporosis International* 14, S35-S42.
- Zapata, J.E., Giraldo, D.E., Baéz, A.J. (2018). Kinetic modeling of the enzymatic hydrolysis of proteins of viscera from red tilapia (*Oreochromis sp.*): Effect of substrate and enzyme concentration. *Vitae* 25(1), 17-25.
- Zapata, J.E., Moya, M., Figueroa, O.A. (2019). Hidrólisis enzimática de la proteína de vísceras de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*): efecto del tipo de enzima, temperatura, pH y velocidad de agitación. *Información Tecnológica* 30(6), 63-72.
- Zhang, H., Wang, L., Shen, Q., Wu, B, Gao, P. (2011). A novel approach for estimating the relationship between the kinetics and thermodynamics of glycoside hydrolases. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 43, 409–417.

- Zhang, Y., Wang, W., Wang, X., Zhang, J. (2014). Bone soup: protein nutrition and enzymatic hydrolysis process optimized by response surface method. *Journal of Food and Nutrition Research* 53(1), 1–12.
- Zígolo, M.A. (2017). Lipasas como biocatalizadores en la síntesis de derivados de ácidos biliares, fenilacéticos sustituidos y glicirretínico. Tesis doctoral. Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos en Química Orgánica, Buenos Aires, Argentina.
- Zin, N.B.M., Yusof, B.M., Oslan, S.N., Wasoh, H., Tan, J.S., Ariff, A.B., Halim, M. (2017). Utilization of acid pre-treated coconut dregs as a substrate for production of detergent compatible lipase by *Bacillus stratosphericus*. *AMB Express* 7, 1-13.

**ANEXO I: CARACTERIZACIÓN DEL
RESIDUO DE CARNICERÍA**

Tabla I.1.- Contenido en humedad del residuo de carnicería

Muestra	Humedad (%)
1	44,89
2	44,95
3	43,83
4	43,95
5	45,45
6	47,15
Valor medio	45,04
Desviación estándar	1,24

Tabla I.2.- Contenido en proteína del residuo de carnicería (base seca)

Muestra	Proteína (%)
1	18,77
2	18,42
3	19,18
4	19,22
5	18,93
6	19,66
Valor medio	19,03
Desviación estándar	0,42

Tabla I.3.- Contenido en lípidos del residuo de carnicería (base seca)

Muestra	Lípidos (%)
1	68,52
2	68,20
3	70,41
4	70,26
5	68,44
6	67,65
Valor medio	68,91
Desviación estándar	1,14

Tabla I.4.- Contenido en fibra del residuo de carnicería (base seca)

Muestra	Fibra (%)
1	0,99
2	1,52
3	0,98
4	1,07
5	1,53
6	1,13
Valor medio	1,20
Desviación estándar	0,26

Tabla I.5.- Contenido en ceniza del residuo de carnicería (base seca)

Muestra	Cenizas (%)
1	7,21
2	6,94
3	7,55
4	7,09
5	7,11
6	6,92
Valor medio	7,14
Desviación estándar	0,23

Tabla I.6.- Contenido en colágeno del residuo de carnicería (base seca)

Muestra	Colágeno (mg/g)
1	67,86
2	67,83
3	68,15
4	67,88
5	67,78
6	67,98
Valor medio	67,91
Desviación estándar	0,14

Tabla I.7.- Composición en ácidos grasos de los lípidos del residuo de carnicería

Ácido Graso (%)	Muestra						Media (%)	Desviación estándar (%)
	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	5 (%)	6 (%)		
C4:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C6:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C8:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C10:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C11:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C12:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C13:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C14:0	4,26	4,41	4,14	4,19	4,23	4,29	4,25	0,09
C14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0	0,29	0,29	0,24	0,30	0,22	0,26	0,27	0,03
C15:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C16:0	25,40	25,19	25,47	25,35	25,36	25,95	25,45	0,26
C16:1	0,29	0,28	0,31	0,31	0,30	0,32	0,30	0,01
C17:0	3,50	3,55	3,46	3,51	3,57	3,30	3,48	0,10
C17:1	0,32	0,30	0,29	0,34	0,33	0,35	0,32	0,02
C18:0	12,84	12,96	12,62	13,17	12,98	12,51	12,85	0,24
C18:1n9c+t	24,49	24,52	25,33	24,46	24,45	24,61	24,64	0,34
C18:2n6c+t	10,78	10,69	10,14	10,19	10,63	10,58	10,50	0,27
C18:3n3	3,03	3,05	3,06	3,15	3,07	3,19	3,09	0,06
C18:3n6	0,22	0,24	0,23	0,21	0,23	0,20	0,22	0,01
C20:0	0,32	0,31	0,37	0,34	0,34	0,36	0,34	0,02
C20:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:2	1,71	1,79	1,81	1,72	1,81	1,69	1,76	0,05
C20:3n3	4,93	4,81	4,82	4,87	4,83	4,91	4,86	0,05
C20:3n6+c21:0	3,82	3,87	3,96	3,97	3,89	3,75	3,88	0,08
C20:4n6	3,80	3,74	3,75	3,92	3,76	3,73	3,78	0,07
C20:5n3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:1n9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C23:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:6+C24:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	

Tabla I.8.- Densidad del residuo de carnicería

Muestra	Densidad (g/ml)
1	1,25
2	1,11
3	1,43
4	1,11
5	1,00
6	1,25
Valor medio	1,19
Desviación estándar	0,15

Tabla I.9.- Índice de saponificación del residuo de carnicería (base seca)

Muestra	Índice de saponificación
1	201,19
2	202,87
3	199,39
4	197,69
5	198,69
6	201,43
Valor medio	200,21
Desviación estándar	1,94

**ANEXO II: HIDRÓLISIS CON
PROTEASAS**

**A) INFLUENCIA DEL TIPO DE
PROTEASA**

Tabla IIA.1.- GH obtenido con Neutrasa ($S_o=17,45$ g/l, $E_o=2,81$ UA/l, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4,48	0,25	1,79	0,33	0,10	0,71
9,27	0,40	2,86	2,78	0,25	1,78
17,42	0,50	3,58	10,05	0,40	2,85
25,50	0,55	3,94	24,83	0,50	3,56
48,18	0,60	4,30	42,33	0,60	4,27
61,65	0,70	5,01	69,53	0,70	4,98
105,28	0,85	6,09	143,33	1,00	7,12
121,70	0,90	6,45	184,82	1,05	7,48
143,17	0,95	6,80	249,35	1,10	7,83
243,68	1,00	7,16			

Tabla IIA.2.- GH obtenido con PTN (So=17,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,18	0,10	0,71	0,48	0,25	1,79
0,67	0,20	1,43	1,08	0,40	2,86
1,22	0,30	2,14	1,50	0,50	3,57
1,58	0,50	3,57	2,30	0,70	5,00
1,92	0,60	4,29	3,68	0,80	5,72
2,65	0,70	5,00	5,18	0,90	6,43
3,93	0,75	5,36	7,95	1,00	7,15
4,40	0,80	5,72	12,02	1,20	8,58
6,52	1,00	7,15	14,60	1,30	9,29
8,67	1,10	7,86	16,20	1,40	10,01
11,27	1,20	8,58	22,38	1,50	10,72
16,73	1,30	9,29	32,28	1,60	11,44
23,27	1,50	10,72	44,47	1,70	12,15
32,58	1,60	11,44	63,70	1,80	12,87
42,67	1,70	12,15	73,00	1,90	13,58
71,62	1,90	13,58	100,67	2,00	14,30
115,33	2,10	15,01	118,57	2,10	15,01
143,40	2,20	15,73	140,38	2,20	15,73
184,63	2,30	16,44	180,92	2,30	16,44
242,65	2,40	17,15	235,20	2,40	17,15

Tabla IIA.3.- GH obtenido con Flavourzyme ($S_0=17,45$ g/l, $E_0=2,81$ UA/l, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,66 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,93	0,30	2,13	1,10	0,30	2,25
1,55	0,40	2,84	1,83	0,50	3,74
2,22	0,60	4,25	2,55	0,70	5,24
2,63	0,80	5,67	3,08	0,90	6,74
8,25	1,10	7,80	9,25	1,20	8,98
14,33	1,30	9,22	15,33	1,40	10,48
21,08	1,50	10,64	22,08	1,60	11,98
23,65	1,60	11,35	24,65	1,60	11,98
43,45	1,80	12,76	44,45	1,80	13,47
90,78	2,00	14,18	95,78	2,00	14,97
125,43	2,10	14,89	130,43	2,10	15,72
138,58	2,20	15,60	150,58	2,20	16,47
178,43	2,30	16,31	190,43	2,30	17,21
237,83	2,40	17,02	242,83	2,40	17,96

Tabla IIA.4.- GH obtenido con Protamex (So=17,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,18	0,20	1,42	0,18	0,10	0,71
1,37	0,30	2,13	0,68	0,20	1,42
2,08	0,40	2,84	0,98	0,30	2,13
3,50	0,50	3,55	2,93	0,50	3,55
4,32	0,70	4,98	4,17	0,60	4,26
5,08	0,80	5,69	5,83	0,75	5,32
6,60	0,90	6,40	6,87	0,90	6,38
8,22	1,10	7,82	8,35	1,00	7,09
9,95	1,20	8,53	9,82	1,10	7,80
13,50	1,40	9,95	10,77	1,25	8,87
16,67	1,50	10,66	12,62	1,30	9,22
22,72	1,70	12,09	14,15	1,40	9,93
25,83	1,80	12,80	16,10	1,50	10,64
29,17	2,00	14,22	18,17	1,60	11,35
36,02	2,10	14,93	20,05	1,70	12,06
40,57	2,30	16,35	22,88	1,80	12,77
50,02	2,50	17,77	25,83	1,90	13,48
62,52	2,60	18,48	29,05	2,00	14,19
75,63	2,80	19,91	34,03	2,10	14,90
89,50	2,90	20,62	37,77	2,25	15,96
109,58	3,10	22,04	42,40	2,30	16,31
144,33	3,25	23,10	46,93	2,40	17,02
156,28	3,30	23,46	50,08	2,50	17,73
170,60	3,35	23,82	61,77	2,60	18,44
182,93	3,40	24,17	65,28	2,70	19,15
210,50	3,45	24,53	75,40	2,80	19,86
239,10	3,50	24,88	82,10	2,90	20,57
			90,17	3,00	21,28
			100,33	3,10	21,99
			115,10	3,20	22,70
			131,50	3,25	23,05
			145,48	3,30	23,41
			160,53	3,35	23,76
			192,67	3,40	24,12
			236,20	3,45	24,47

Tabla IIA.5.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	0,30	2,15	0,32	0,20	1,43
0,45	0,50	3,58	0,75	0,40	2,86
0,82	0,70	5,01	1,47	0,50	3,57
1,22	0,90	6,45	2,40	0,60	4,29
1,78	1,10	7,88	3,03	0,70	5,00
2,92	1,30	9,31	4,13	0,80	5,72
4,17	1,50	10,75	5,03	0,90	6,43
5,58	1,60	11,46	6,03	1,00	7,14
7,25	1,70	12,18	7,45	1,10	7,86
9,23	1,80	12,89	8,32	1,20	8,57
11,57	1,90	13,61	9,50	1,30	9,29
14,53	2,00	14,33	10,63	1,40	10,00
17,65	2,10	15,04	12,13	1,50	10,72
21,73	2,20	15,76	13,73	1,60	11,43
25,30	2,30	16,48	15,95	1,70	12,14
29,13	2,40	17,19	18,03	1,80	12,86
33,65	2,50	17,91	19,95	1,90	13,57
39,48	2,60	18,62	21,28	2,00	14,29
45,50	2,70	19,34	23,37	2,10	15,00
52,78	2,80	20,06	25,40	2,20	15,72
58,63	2,90	20,77	27,82	2,30	16,43
66,23	3,00	21,49	30,47	2,40	17,15
73,48	3,10	22,21	33,42	2,50	17,86
81,68	3,20	22,92	36,33	2,60	18,57
96,22	3,30	23,64	40,62	2,70	19,29
107,75	3,40	24,36	44,18	2,80	20,00
123,73	3,50	25,07	47,47	2,90	20,72
152,17	3,60	25,79	52,67	3,00	21,43
182,25	3,70	26,50	56,82	3,10	22,15
214,17	3,80	27,22	72,02	3,20	22,86
242,38	3,90	27,94	85,28	3,30	23,57
			108,62	3,40	24,29
			146,78	3,50	25,00
			160,37	3,60	25,72
			214,67	3,70	26,43
			240,55	3,80	27,15

Tabla IIA.6.- Residuo no solubilizado para distintos tipos de proteasas

Proteasa	Residuo seco inicial (g)	Residuo seco final (g)	Porcentaje de Residuo no solubilizado (%)	Porcentaje de Residuo no solubilizado Media±Desviación estándar (%)
Alcalasa ¹	27,4857	5,7719	21,00	21,53±0,74
Alcalasa ²	27,5607	6,0782	22,05	
Protamex ¹	27,696	5,9779	21,58	22,04±0,75
Protamex ²	27,7584	6,2457	22,50	
Flavouryme ¹	27,7673	6,4724	23,31	24,26±1,35
Flavouryme ²	27,7673	7,003	25,22	
PTN ¹	27,5455	7,6966	27,94	25,98±1,77
PTN ²	27,5828	6,6246	24,02	
Neutrasa ¹	27,4937	9,8505	35,83	34,16±1,35
Neutrasa ²	27,6511	8,9867	32,50	

¹Experimento 1

²Experimento 2

Tabla IIA.7.- Proteína solubilizada para distintos tipos de proteasas

Proteasa	Proteína inicial (g)*	Proteína solubilizada (g)*	Porcentaje de proteína solubilizada (%)	Porcentaje de proteína solubilizada Media±Desviación estándar (%)
Alcalasa ¹	5,2305	2,3626	45,17	45,03±0,20
Alcalasa ²	5,2448	2,3543	44,89	
Protamex ¹	5,2705	2,2031	41,80	41,99±0,27
Protamex ²	5,2824	2,2285	42,19	
Flavouryme ¹	5,2841	1,7095	32,35	31,96±0,55
Flavouryme ²	5,2705	1,6638	31,57	
PTN ¹	5,2419	1,6534	31,54	31,01±0,75
PTN ²	5,2490	1,5999	30,48	
Neutrasa ¹	5,2320	1,0290	19,67	19,53±0,96
Neutrasa ²	5,2351	1,0150	19,39	

¹ Experimento 1² Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIA.8.- Colágeno no hidrolizado para distintos tipos de proteasas

Proteasa	Colágeno inicial (mg/g)*	Colágeno en fase sólida (mg/g)*	Porcentaje de colágeno no hidrolizado (%)	Porcentaje de colágeno no hidrolizado Media±Desviación estándar (%)
Alcalasa ¹	67,91	29,32	43,17	43,10±0,10
Alcalasa ²	67,91	29,22	43,03	
Protamex ¹	67,91	32,7805	48,27	47,78±0,69
Protamex ²	67,91	32,1178	47,29	
Flavouryme ¹	67,91	41,7136	61,42	61,41±0,02
Flavouryme ²	67,91	41,6917	61,39	
PTN ¹	67,91	39,1942	57,71	58,18±0,66
PTN ²	67,91	39,8295	58,65	
Neutrasa ¹	67,91	60,3796	88,91	87,07±2,60
Neutrasa ²	67,91	57,8807	85,23	

¹Experimento 1

²Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIA.9.- Lípidos recuperados para distintos tipos de proteasas

Proteasa	Lípidos iniciales (g)	Lípidos separados (g)	Porcentaje de lípidos recuperados (%)	Porcentaje de lípidos recuperados Media±Desviación estándar (%)
Alcalasa ¹	18,9404	15,8135	83,49	82,62±1,23
Alcalasa ²	18,9921	15,5271	81,76	
Protamex ¹	19,0853	15,3340	80,34	80,84±0,70
Protamex ²	19,1283	15,5573	81,33	
Flavouryme ¹	19,1344	14,0072	73,20	73,23±0,04
Flavouryme ²	19,1344	14,0181	73,26	
PTN ¹	18,9816	14,0420	73,98	73,84±0,20
PTN ²	19,0073	14,0082	73,70	
Neutrasa ¹	18,9459	13,2565	69,97	69,98±0,01
Neutrasa ²	19,0544	13,3351	69,98	

¹Experimento 1²Experimento 2

Tabla IIA.10.- Distribución en porcentaje de ácidos grasos en lípidos recuperados para distintos tipos de proteasas

Ácido	Alcalasa			Neutrasa			Flavourzyme			Protamex			PTN		
	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación
C14:0	4,20	4,26	4,23±0,04	4,18	4,1	4,14±0,06	4,38	4,24	4,31±0,10	4,45	4,29	4,37±0,11	4,32	4,18	4,25±0,10
C14:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C15:0	0,22	0,22	0,22±0,00	0,37	0,39	0,38±0,01	0,39	0,39	0,39±0,01	0,23	0,29	0,26±0,04	0,31	0,29	0,30±0,01
C15:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C16:0	25,56	25,16	25,36±0,28	26,1	25,76	25,93±0,24	25,01	25,75	25,38±0,52	24,79	25,47	25,13±0,48	25,11	25,37	25,24±0,18
C16:1	0,19	0,21	0,20±0,01	0,34	0,36	0,35±0,01	0,28	0,28	0,28±0,01	0,60	0,56	0,58±0,03	0,18	0,20	0,19±0,01
C17:0	3,60	3,54	3,57±0,04	3,86	3,74	3,80±0,08	3,44	3,38	3,41±0,04	3,89	3,75	3,82±0,10	3,40	3,52	3,46±0,08
C17:1	0,32	0,34	0,33±0,01	0,36	0,4	0,38±0,03	0,50	0,47	0,49±0,02	0,50	0,52	0,51±0,01	0,27	0,31	0,29±0,03
C18:0	13,1	12,86	12,98±0,17	13,24	12,86	13,05±0,27	12,70	12,26	12,48±0,31	12,16	12,56	12,36±0,28	12,58	13,10	12,84±0,37
C18:1n9c+t	24,38	24,72	24,55±0,24	24,01	24,39	24,20±0,27	25,15	24,29	24,72±0,61	25,33	24,29	24,38±0,78	25,12	24,78	24,95±0,24
C18:2n6c+t	10,48	10,77	10,63±0,21	10,48	10,86	10,67±0,27	10,65	11,00	10,83±0,25	10,86	10,56	10,71±0,21	11,00	10,54	10,77±0,33
C18:3n3	3,12	3,02	3,07±0,07	2,94	2,92	2,93±0,01	2,85	2,77	2,81±0,06	3,16	3,08	3,12±0,06	3,30	3,22	3,26±0,06
C18:3n6	0,23	0,23	0,23±0,00	0,32	0,34	0,33±0,01	0,29	0,33	0,31±0,03	0,54	0,58	0,56±0,03	0,20	0,20	0,20±0,00
C20:0	0,35	0,33	0,34±0,01	0,43	0,41	0,42±0,01	0,52	0,50	0,51±0,01	0,42	0,44	0,43±0,01	0,40	0,36	0,38±0,03
C20:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C20:2	1,77	1,85	1,81±0,06	1,95	1,89	1,92±0,04	1,95	2,01	1,98±0,04	1,89	1,94	1,91±0,04	2,00	2,08	2,04±0,06
C20:3n3	4,76	4,91	4,83±0,11	4,43	4,51	4,47±0,06	4,71	4,95	4,83±0,17	4,44	4,58	4,51±0,10	4,80	4,92	4,86±0,08
C20:3n6+c21:0	3,82	3,94	3,89±0,08	3,02	3,22	3,12±0,14	3,52	3,60	3,56±0,06	3,47	3,55	3,51±0,06	3,15	3,21	3,18±0,04
C20:4n6	3,69	3,81	3,76±0,08	3,99	3,83	3,91±0,11	3,66	3,76	3,53±0,07	3,90	3,79	3,84±0,08	3,86	3,72	3,79±0,10
TOTAL	100	100		100	100		100	100		100	100		100	100	

1* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 1

2* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 2

**B) INFLUENCIA DE LA
CONCENTRACIÓN DE ALCALASA**

Tabla IIB.1.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=0,94 UA/l, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,15	0,20	1,43	0,18	0,20	1,43
0,72	0,40	2,86	0,88	0,30	2,15
1,57	0,60	4,29	1,72	0,40	2,87
2,42	0,80	5,72	3,10	0,50	3,58
3,37	1,00	7,15	4,70	0,60	4,30
5,25	1,10	7,87	5,42	0,70	5,02
6,87	1,20	8,58	6,13	0,80	5,73
8,47	1,30	9,3	6,13	0,90	6,45
10,88	1,40	10,01	9,42	1,00	7,16
13,75	1,50	10,73	11,35	1,10	7,88
19,12	1,60	11,44	13,15	1,20	8,60
24,22	1,70	12,16	15,05	1,30	9,31
29,87	1,80	12,87	17,10	1,40	10,03
34,73	1,90	13,59	19,73	1,50	10,75
41,17	2,00	14,3	22,28	1,60	11,46
52,55	2,10	15,02	25,23	1,70	12,18
60,95	2,20	15,73	28,53	1,80	12,90
75,28	2,30	16,45	32,08	1,90	13,61
96,05	2,40	17,16	36,03	2,00	14,33
126,35	2,50	17,88	39,67	2,10	15,05
157,48	2,60	18,59	43,75	2,20	15,76
182,52	2,70	19,31	49,12	2,30	16,48
217,47	2,80	20,02	52,87	2,40	17,20
			60,30	2,50	17,91
			73,02	2,60	18,63
			108,38	2,70	19,35
			127,27	2,80	20,06
			155,85	2,90	20,78
			182,12	3,00	21,49
			225,02	3,10	22,21

Tabla IIB.2.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=1,87 UA/l, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,17	0,20	1,43	0,23	0,30	2,15
0,73	0,40	2,86	0,42	0,40	2,86
1,15	0,60	4,29	0,92	0,50	3,58
1,97	0,80	5,72	1,33	0,60	4,29
4,22	1,00	7,16	1,70	0,70	5,01
7,35	1,20	8,59	2,22	0,80	5,72
10,90	1,40	10,02	3,02	0,90	6,44
15,70	1,60	11,45	3,93	1,00	7,15
20,80	1,80	12,88	4,93	1,10	7,87
25,78	2,00	14,31	5,87	1,20	8,58
31,98	2,20	15,74	6,92	1,30	9,30
35,82	2,30	16,46	8,70	1,40	10,02
41,32	2,40	17,17	9,87	1,50	10,73
46,72	2,50	17,89	10,98	1,60	11,45
52,15	2,60	18,60	11,95	1,70	12,16
59,48	2,70	19,32	12,80	1,80	12,88
71,22	2,80	20,03	14,78	1,90	13,59
84,15	2,90	20,75	16,88	2,00	14,31
99,18	3,00	21,47	18,75	2,10	15,02
125,17	3,10	22,18	20,77	2,20	15,74
159,02	3,20	22,90	25,15	2,30	16,45
193,23	3,30	23,61	36,28	2,40	17,17
229,35	3,40	24,33	42,88	2,50	17,88
			54,98	2,60	18,60
			87,77	2,70	19,32
			115,25	2,80	20,03
			149,20	2,90	20,75
			172,75	3,00	21,46
			202,40	3,10	22,18
			236,50	3,20	22,89

Tabla IIB.3.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	0,30	2,15	0,32	0,20	1,43
0,45	0,50	3,58	0,75	0,40	2,86
0,82	0,70	5,01	1,47	0,50	3,57
1,22	0,90	6,45	2,40	0,60	4,29
1,78	1,10	7,88	3,03	0,70	5,00
2,92	1,30	9,31	4,13	0,80	5,72
4,17	1,50	10,75	5,03	0,90	6,43
5,58	1,60	11,46	6,03	1,00	7,14
7,25	1,70	12,18	7,45	1,10	7,86
9,23	1,80	12,89	8,32	1,20	8,57
11,57	1,90	13,61	9,50	1,30	9,29
14,53	2,00	14,33	10,63	1,40	10,00
17,65	2,10	15,04	12,13	1,50	10,72
21,73	2,20	15,76	13,73	1,60	11,43
25,30	2,30	16,48	15,95	1,70	12,14
29,13	2,40	17,19	18,03	1,80	12,86
33,65	2,50	17,91	19,95	1,90	13,57
39,48	2,60	18,62	21,28	2,00	14,29
45,50	2,70	19,34	23,37	2,10	15,00
52,78	2,80	20,06	25,40	2,20	15,72
58,63	2,90	20,77	27,82	2,30	16,43
66,23	3,00	21,49	30,47	2,40	17,15
73,48	3,10	22,21	33,42	2,50	17,86
81,68	3,20	22,92	36,33	2,60	18,57
96,22	3,30	23,64	40,62	2,70	19,29
107,75	3,40	24,36	44,18	2,80	20,00
123,73	3,50	25,07	47,47	2,90	20,72
152,17	3,60	25,79	52,67	3,00	21,43
182,25	3,70	26,50	56,82	3,10	22,15
214,17	3,80	27,22	72,02	3,20	22,86
242,38	3,90	27,94	85,28	3,30	23,57
			108,62	3,40	24,29
			146,78	3,50	25,00
			160,37	3,60	25,72
			214,67	3,70	26,43
			240,55	3,80	27,15

Tabla IIB.4.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=3,74 UA/l, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,17	0,30	2,15	0,25	0,20	1,43
0,25	0,50	3,58	0,43	0,40	2,86
0,52	0,70	5,01	0,82	0,50	3,57
0,83	0,80	5,73	1,50	0,60	4,28
1,17	0,90	6,44	1,92	0,70	5,00
1,47	1,00	7,16	2,33	0,80	5,71
1,85	1,10	7,87	2,85	0,90	6,43
2,35	1,20	8,59	3,33	1,00	7,14
2,87	1,30	9,31	4,12	1,10	7,85
3,53	1,40	10,02	5,02	1,20	8,55
4,37	1,50	10,74	5,75	1,30	9,28
4,85	1,60	11,45	7,43	1,40	9,99
5,97	1,70	12,17	8,68	1,50	10,71
7,57	1,80	12,89	9,60	1,60	11,42
7,92	1,90	13,60	10,65	1,70	12,14
8,50	2,00	14,32	11,20	1,80	12,85
9,83	2,10	15,03	13,67	1,90	13,56
11,22	2,20	15,75	15,22	2,00	14,28
14,15	2,30	16,46	16,83	2,10	14,99
16,08	2,40	17,18	19,50	2,20	15,71
18,98	2,50	17,90	21,75	2,30	16,42
22,28	2,60	18,61	25,43	2,40	17,13
24,80	2,70	19,33	28,12	2,50	17,85
27,50	2,80	20,04	31,25	2,60	18,56
31,15	2,90	20,76	35,08	2,70	19,28
35,02	3,00	21,48	37,08	2,80	19,99
41,08	3,10	22,19	43,95	2,90	20,70
46,33	3,20	22,91	48,88	3,00	21,42
53,73	3,30	23,62	55,33	3,10	22,13
62,30	3,40	24,34	57,63	3,20	22,84
79,43	3,50	25,05	69,50	3,30	23,56
100,37	3,60	25,77	77,37	3,40	24,27
115,03	3,70	26,49	83,90	3,50	24,99
145,28	3,80	27,20	91,23	3,60	25,70
204,25	3,90	27,92	102,85	3,70	26,41
			119,22	3,80	27,13
			139,73	3,90	27,84
			163,20	4,00	28,56
			195,17	4,10	29,27
			221,20	4,20	29,98

Tabla IIB.5.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=4,68 UA/l, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	0,40	2,86	0,20	0,30	2,15
0,40	0,60	4,29	0,47	0,50	3,58
0,63	0,80	5,72	0,72	0,70	5,01
0,98	0,90	6,44	1,02	0,90	6,44
1,47	1,10	7,87	1,35	1,10	7,87
1,83	1,30	9,30	1,73	1,30	9,31
2,35	1,40	10,02	1,98	1,50	10,74
2,77	1,50	10,73	2,53	1,60	11,45
3,68	1,60	11,45	2,90	1,70	12,17
4,28	1,70	12,16	3,25	1,80	12,88
6,43	1,90	13,59	3,67	1,90	13,60
7,37	2,00	14,31	4,70	2,10	15,03
8,38	2,10	15,02	5,23	2,20	15,75
9,47	2,20	15,74	6,07	2,30	16,46
10,82	2,30	16,45	7,75	2,40	17,18
13,10	2,40	17,17	8,28	2,50	17,90
15,17	2,50	17,89	10,37	2,60	18,61
17,68	2,60	18,60	12,77	2,70	19,33
19,02	2,70	19,32	15,38	2,80	20,04
23,12	2,80	20,03	18,92	2,90	20,76
26,28	2,90	20,75	22,47	3,00	21,47
29,33	3,00	21,46	27,32	3,10	22,19
35,78	3,10	22,18	32,23	3,20	22,91
38,85	3,20	22,89	37,13	3,30	23,62
43,15	3,30	23,61	41,18	3,40	24,34
48,73	3,40	24,32	47,15	3,50	25,05
54,52	3,50	25,04	53,45	3,60	25,77
59,95	3,60	25,76	59,52	3,70	26,49
67,03	3,70	26,47	67,42	3,80	27,20
82,83	3,80	27,19	83,20	3,90	27,92
100,73	3,90	27,90	94,50	4,00	28,63
115,92	4,00	28,62	106,28	4,10	29,35
127,83	4,10	29,33	135,13	4,20	30,06
140,72	4,20	30,05	155,18	4,30	30,78
151,32	4,30	30,76	170,72	4,40	31,50
167,08	4,40	31,48	203,73	4,50	32,21
182,70	4,50	32,19	238,25	4,60	32,93
192,45	4,60	32,91			
242,23	4,70	33,62			

Tabla IIB.6.- Residuo no solubilizado para distintas concentraciones de Alcalasa (Eo)

Eo (UA/l)	Residuo seco inicial (g)	Residuo seco final (g)	Porcentaje de Residuo no solubilizado (%)	Porcentaje de Residuo no solubilizado Media±Desviación estándar (%)
0,94 ¹	27,5372	12,844	46,64	45,13±2,14
0,94 ²	27,4800	11,9851	43,61	
1,87 ¹	27,5177	8,3472	30,33	31,40±1,51
1,87 ²	27,5227	8,9361	32,47	
2,81 ¹	27,4857	5,7719	21,00	21,53±0,74
2,81 ²	27,5607	6,0782	22,05	
3,74 ¹	27,5045	4,2231	15,35	15,33±0,03
3,74 ²	27,5795	4,2231	15,31	
4,68 ¹	27,5209	1,0178	3,70	5,47±2,5
4,68 ²	27,5055	1,9891	7,23	

¹Experimento 1

²Experimento 2

Tabla IIB.7.- Proteína solubilizada para distintas concentraciones de Alcalasa (Eo)

Eo (UA/l)	Proteína inicial (g)*	Proteína solubilizada (g)*	Porcentaje de proteína solubilizada (%)	Porcentaje de proteína solubilizada Media±Desviación estándar (%)
0,94 ¹	5,2403	1,6923	32,29	32,64±0,50
0,94 ²	5,2294	1,7254	32,99	
1,87 ¹	5,2366	2,1143	40,38	40,57±0,27
1,87 ²	5,2376	2,135	40,76	
2,81 ¹	5,2305	2,3626	45,17	45,03±0,20
2,81 ²	5,2448	2,3543	44,89	
3,74 ¹	5,2341	2,6232	50,12	49,93±0,26
3,74 ²	5,2484	2,6108	49,74	
4,68 ¹	5,2372	2,8425	54,28	54,05±0,31
4,68 ²	5,2343	2,8177	53,83	

¹Experimento 1²Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIB.8.- Colágeno no hidrolizado para distintas concentraciones de Alcalasa (Eo)

Eo (UA/l)	Colágeno inicial (mg/g)*	Colágeno en fase sólida (mg/g)*	Porcentaje de colágeno no hidrolizado (%)	Porcentaje de colágeno no hidrolizado Media±Desviación estándar (%)
0,94 ¹	67,91	46,44	68,38	68,17±0,30
0,94 ²	67,91	46,15	67,96	
1,87 ¹	67,91	36,6	53,89	53,85±0,06
1,87 ²	67,91	36,54	53,81	
2,81 ¹	67,91	29,32	43,17	43,10±0,10
2,81 ²	67,91	29,22	43,03	
3,74 ¹	67,91	23,38	34,43	34,39±0,05
3,74 ²	67,91	23,33	34,35	
4,68 ¹	67,91	18,47	27,20	27,03±0,24
4,68 ²	67,91	18,24	26,86	

¹Experimento 1

²Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIB.9.- Lípidos recuperados para distintas concentraciones de Alcalasa (Eo)

Eo (UA/l)	Lípidos iniciales (g)	Lípidos separados (g)	Porcentaje de lípidos recuperados (%)	Porcentaje de lípidos recuperados Media±Desviación estándar (%)
0,94 ¹	18,9759	5,9711	31,47	37,53±3,58
0,94 ²	18,9365	8,2557	43,60	
1,87 ¹	19,9624	11,1321	55,77	55,54±4,77
1,87 ²	18,9659	10,4928	55,32	
2,81 ¹	18,9404	15,8135	83,49	82,62±1,23
2,81 ²	18,9921	15,5271	81,76	
3,74 ¹	18,9533	17,9121	94,51	94,04±0,65
3,74 ²	19,005	17,7855	93,58	
4,68 ¹	18,9647	19,0027	100,00	100,00±0,01
4,68 ²	18,954	18,9904	100,00	

¹Experimento 1²Experimento 2

Tabla IIB.10.- Distribución en porcentaje de ácidos grasos en lípidos recuperados para distintas concentraciones de Alcalasa (Eo)

Ácido	Eo = 0,94 UA/l			Eo = 1,87 UA/l			Eo = 2,81 UA/l			Eo = 3,74 UA/l			Eo = 4,68 UA/l		
	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación
C14:0	4,32	4,19	4,26±0,09	4,38	4,25	4,32±0,09	4,20	4,26	4,23±0,04	4,34	4,21	4,28±0,09	4,28	4,17	4,23±0,08
C14:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C15:0	0,30	0,28	0,29±0,01	0,20	0,18	0,19±0,01	0,22	0,22	0,22±0,00	0,25	0,23	0,24±0,01	0,24	0,22	0,23±0,01
C15:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C16:0	25,06	25,74	25,40±0,48	24,82	25,56	25,19±0,52	25,56	25,16	25,36±0,28	25,10	25,80	25,45±0,49	25,00	25,70	25,35±0,49
C16:1	0,31	0,27	0,29±0,03	0,29	0,27	0,28±0,01	0,19	0,21	0,20±0,01	0,52	0,50	0,51±0,01	0,56	0,54	0,55±0,01
C17:0	3,25	3,15	3,20±0,07	3,28	3,20	3,24±0,06	3,60	3,54	3,57±0,04	3,13	3,04	3,09±0,06	3,54	3,44	3,49±0,07
C17:1	0,53	0,51	0,52±0,01	0,51	0,51	0,51±0,01	0,32	0,34	0,33±0,01	0,50	0,50	0,50±0,01	0,54	0,52	0,53±0,01
C18:0	12,50	12,84	12,67±0,24	12,54	12,86	12,70±0,23	13,1	12,86	12,98±0,17	12,54	12,96	12,75±0,30	12,54	12,70	12,62±0,11
C18:1n9c+t	24,20	24,78	24,49±0,41	24,55	24,82	24,79±0,19	24,38	24,72	24,55±0,24	24,30	24,92	24,61±0,44	24,20	24,80	24,50±0,42
C18:2n6c+t	11,02	10,54	10,78±0,34	11,00	10,64	10,82±0,25	10,48	10,77	10,63±0,21	10,92	10,54	10,73±0,27	10,65	10,35	10,50±0,21
C18:3n3	3,06	3,00	3,03±0,04	3,06	3,00	3,03±0,04	3,12	3,02	3,07±0,07	3,07	3,00	3,04±0,05	3,17	3,10	3,14±0,05
C18:3n6	0,40	0,38	0,39±0,01	0,39	0,38	0,38±0,01	0,23	0,23	0,23±0,00	0,35	0,35	0,35±0,01	0,23	0,23	0,23±0,00
C20:0	0,43	0,41	0,42±0,01	0,41	0,39	0,40±0,01	0,35	0,33	0,34±0,01	0,52	0,50	0,51±0,01	0,29	0,26	0,28±0,02
C20:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C20:2	1,74	1,68	1,71±0,04	1,69	1,63	1,66±0,04	1,77	1,85	1,81±0,06	1,83	1,78	1,81±0,04	1,66	1,72	1,69±0,04
C20:3n6+c21:0	4,00	3,86	3,93±0,10	3,89	3,77	3,83±0,08	3,82	3,94	3,89±0,08	3,78	3,68	3,73±0,07	3,98	3,86	3,92±0,08
C20:3n3	4,88	4,76	4,82±0,08	4,78	4,67	4,73±0,08	4,76	4,91	4,83±0,11	4,68	4,56	4,62±0,08	4,91	4,77	4,84±0,10
C20:4n6	3,86	3,74	3,80±0,08	3,99	3,87	3,93±0,08	3,69	3,81	3,76±0,08	3,83	3,72	3,78±0,08	3,96	3,83	3,90±0,09
TOTAL	100	100		100	100		100	100		100	100		100	100	

1* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 1

2* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 2

**C) INFLUENCIA DE LA
CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO
PROTEICO**

Tabla IIC.1.- GH obtenido con Alcalasa (So=3,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,15	0,10	3,54	0,12	0,10	3,54
0,33	0,20	7,08	0,30	0,20	7,09
0,57	0,30	10,62	0,48	0,30	10,63
0,75	0,40	14,15	0,63	0,40	14,17
1,58	0,50	17,69	1,42	0,50	17,17
3,25	0,60	21,23	3,68	0,60	21,26
10,03	0,70	24,77	8,07	0,70	24,80
20,50	0,80	28,31	18,62	0,80	28,34
48,52	0,90	31,85	56,58	0,90	31,89
93,65	1,00	35,39	126,95	1,00	35,43
138,97	1,10	38,93	193,30	1,10	38,97
255,35	1,20	42,46	255,18	1,20	42,51

Tabla IIC.2.- GH obtenido con Alcalasa (So=10,48 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,17	0,30	3,50	0,17	0,20	2,38
0,47	0,50	5,84	0,28	0,40	4,76
1,08	0,60	7,00	0,42	0,50	5,95
1,50	0,70	8,17	0,80	0,60	7,14
2,17	0,80	9,34	1,08	0,70	8,33
3,00	0,90	10,51	1,60	0,80	9,52
3,83	1,00	11,67	2,52	0,90	10,71
4,82	1,10	12,84	3,35	1,00	11,89
6,70	1,20	14,01	3,98	1,10	13,08
8,12	1,30	15,17	4,47	1,20	14,27
10,22	1,40	16,34	5,92	1,30	15,46
13,13	1,50	17,51	7,25	1,40	16,65
16,10	1,60	18,68	9,02	1,50	17,84
20,25	1,70	19,84	10,25	1,60	19,03
24,68	1,80	21,01	11,63	1,70	20,22
30,75	1,90	22,18	13,00	1,80	21,41
36,08	2,00	23,35	15,25	1,90	22,60
44,03	2,10	24,51	18,03	2,00	23,79
50,70	2,20	25,68	21,23	2,10	24,98
69,25	2,30	26,85	28,17	2,20	26,17
93,67	2,40	28,01	39,28	2,30	27,36
114,72	2,50	29,18	45,47	2,40	28,55
155,62	2,60	30,35	54,32	2,50	29,74
235,48	2,70	31,52	97,28	2,60	30,93
			147,83	2,70	32,12
			225,28	2,80	33,31

Tabla IIC.3.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	0,30	2,15	0,32	0,20	1,43
0,45	0,50	3,58	0,75	0,40	2,86
0,82	0,70	5,01	1,47	0,50	3,57
1,22	0,90	6,45	2,40	0,60	4,29
1,78	1,10	7,88	3,03	0,70	5,00
2,92	1,30	9,31	4,13	0,80	5,72
4,17	1,50	10,75	5,03	0,90	6,43
5,58	1,60	11,46	6,03	1,00	7,14
7,25	1,70	12,18	7,45	1,10	7,86
9,23	1,80	12,89	8,32	1,20	8,57
11,57	1,90	13,61	9,50	1,30	9,29
14,53	2,00	14,33	10,63	1,40	10,00
17,65	2,10	15,04	12,13	1,50	10,72
21,73	2,20	15,76	13,73	1,60	11,43
25,30	2,30	16,48	15,95	1,70	12,14
29,13	2,40	17,19	18,03	1,80	12,86
33,65	2,50	17,91	19,95	1,90	13,57
39,48	2,60	18,62	21,28	2,00	14,29
45,50	2,70	19,34	23,37	2,10	15,00
52,78	2,80	20,06	25,40	2,20	15,72
58,63	2,90	20,77	27,82	2,30	16,43
66,23	3,00	21,49	30,47	2,40	17,15
73,48	3,10	22,21	33,42	2,50	17,86
81,68	3,20	22,92	36,33	2,60	18,57
96,22	3,30	23,64	40,62	2,70	19,29
107,75	3,40	24,36	44,18	2,80	20,00
123,73	3,50	25,07	47,47	2,90	20,72
152,17	3,60	25,79	52,67	3,00	21,43
182,25	3,70	26,50	56,82	3,10	22,15
214,17	3,80	27,22	72,02	3,20	22,86
242,38	3,90	27,94	85,28	3,30	23,57
			108,62	3,40	24,29
			146,78	3,50	25,00
			160,37	3,60	25,72
			214,67	3,70	26,43
			240,55	3,80	27,15

Tabla IIC.4.- GH obtenido con Alcalasa (So=24,76 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,15	0,30	1,53	0,45	0,40	2,04
0,33	0,50	2,55	0,95	0,60	3,06
0,60	0,70	3,57	2,78	0,80	4,09
0,85	0,90	4,58	3,47	1,00	5,11
1,17	1,10	5,60	3,75	1,10	5,62
1,42	1,20	6,11	4,10	1,20	6,13
1,62	1,30	6,62	4,43	1,30	6,64
1,82	1,40	7,13	4,80	1,40	7,15
2,20	1,50	7,64	5,35	1,50	7,66
2,65	1,60	8,15	5,95	1,60	8,17
2,97	1,70	8,66	6,52	1,70	8,68
3,30	1,80	9,17	7,45	1,80	9,19
3,98	1,90	9,67	8,42	1,90	9,70
4,73	2,00	10,19	9,50	2,00	10,21
5,65	2,10	10,70	10,52	2,10	10,72
6,78	2,20	11,21	11,47	2,20	11,23
8,22	2,30	11,72	12,67	2,30	11,74
9,98	2,40	12,22	13,85	2,40	12,26
11,70	2,50	12,73	15,20	2,50	12,77
14,18	2,60	13,24	16,82	2,60	13,28
16,55	2,70	13,75	18,37	2,70	13,79
19,92	2,80	14,26	20,25	2,80	14,30
23,65	2,90	14,77	22,52	2,90	14,81
27,93	3,00	15,28	25,28	3,00	15,32
36,68	3,10	15,79	28,38	3,10	15,83
40,20	3,20	16,30	31,25	3,20	16,34
46,45	3,30	16,81	35,55	3,30	16,85
50,32	3,40	17,32	39,78	3,40	17,36
55,38	3,50	17,83	45,22	3,50	17,87
65,33	3,60	18,34	51,12	3,60	18,38
75,35	3,70	18,85	57,38	3,70	18,89
86,55	3,80	19,36	70,12	3,80	19,40
99,70	3,90	19,86	79,25	3,90	19,92
109,18	4,00	20,37	87,52	4,00	20,43
124,37	4,10	20,88	98,37	4,10	20,94
139,80	4,20	21,39	113,45	4,20	21,45
151,03	4,30	21,90	141,55	4,30	21,96
165,48	4,40	22,41	159,25	4,40	22,47
185,67	4,50	22,92	179,30	4,50	22,98
210,35	4,60	23,43	205,28	4,60	23,49
239,37	4,70	23,94	239,32	4,70	24,00

Tabla IIC.5.- GH obtenido con Alcalasa (So= 32,10g/l, Eo=2,81 UA/l, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,27	0,20	0,80	0,78	0,10	0,40
0,42	0,30	1,19	1,13	0,20	0,79
0,58	0,40	1,59	1,25	0,30	1,19
0,78	0,50	1,99	1,37	0,40	1,59
0,98	0,60	2,39	1,48	0,50	1,99
1,35	0,70	2,79	1,62	0,60	2,38
1,48	0,80	3,18	1,98	0,80	3,18
1,7	0,90	3,58	2,47	1,00	3,97
1,97	1,00	3,98	2,85	1,20	4,77
2,37	1,10	4,38	3,55	1,40	5,56
2,92	1,20	4,78	4,5	1,60	6,36
3,65	1,30	5,17	5,7	1,80	7,15
4,48	1,40	5,57	6,63	2,00	7,95
5,38	1,60	6,37	7,73	2,20	8,74
6,98	1,80	7,16	8,83	2,40	9,54
8,28	2,00	7,96	9,92	2,60	10,33
10,4	2,20	8,76	11,13	2,80	11,12
12,55	2,30	9,15	13,2	3,00	11,92
14,75	2,60	10,35	15,63	3,20	12,71
16,85	2,80	11,14	17,68	3,40	13,51
19,05	3,00	11,94	19,67	3,60	14,30
22,65	3,40	13,53	22,25	3,80	15,10
25,32	3,60	14,33	26,35	4,00	15,89
28,73	3,80	15,13	28,75	4,10	16,29
32,18	4,00	15,92	31,77	4,20	16,69
37,63	4,20	16,72	36,92	4,40	17,48
43,35	4,30	17,12	42,53	4,60	18,28
49,37	4,40	17,51	48,35	4,70	18,67
55,35	4,50	17,91	55,55	4,80	19,07
63,25	4,60	18,31	63,2	4,90	19,47
69,55	4,70	18,71	72,23	5,00	19,87
75,4	4,80	19,11	79,73	5,10	20,26
82,75	4,90	19,50	86,62	5,20	20,66
90,37	5,00	19,90	93,75	5,30	21,06
100,2	5,10	20,30	101,92	5,40	21,45
123,85	5,20	20,70	132,37	5,50	21,85
143,72	5,30	21,10	160,38	5,60	22,25
167,48	5,40	21,49	214,27	5,80	23,04
192,22	5,50	21,89	237,22	5,85	23,24
211,15	5,60	22,29			
248,17	5,70	22,69			

Tabla IIC.6.- Residuo no solubilizado para distintas concentraciones de sustrato proteico (So)

So (g/l)	Residuo seco inicial (g)	Residuo seco final (g)	Porcentaje de Residuo no solubilizado (%)	Porcentaje de Residuo no solubilizado Media±Desviación estándar (%)
3,45 ¹	5,564	0,1137	2,04	1,84±0,28
3,45 ²	5,5573	0,0912	1,64	
10,48 ¹	16,8675	2,1572	12,79	12,39±0,56
10,48 ²	16,5527	1,5121	12,00	
17,45 ¹	27,4857	5,7719	21,00	21,53±0,75
17,45 ²	27,5607	6,0782	22,05	
24,76 ¹	38,6491	8,0019	20,70	21,99±0,83
24,76 ²	38,6553	9,001	23,29	
32,10 ¹	49,466	10,9223	22,08	22,17±0,13
32,10 ²	49,5047	11,0223	22,27	

¹Experimento 1

²Experimento 2

Tabla IIC.7.- Proteína solubilizada para distintas concentraciones de sustrato proteico (So)

So (g/l)	Proteína inicial (g)*	Proteína solubilizada (g)*	Porcentaje de proteína solubilizada (%)	Porcentaje de proteína solubilizada Media±Desviación estándar (%)
3,45 ¹	1,0588	0,9151	86,43	86,50±0,35
3,45 ²	1,0576	0,9193	86,92	
10,48 ¹	3,2099	2,0625	64,25	64,42±0,24
10,48 ²	3,15	2,0346	64,59	
17,45 ¹	5,2305	2,3622	45,16	45,03±0,20
17,45 ²	5,2448	2,3539	44,88	
24,76 ¹	7,3549	2,6261	35,71	35,42±0,40
24,76 ²	7,3374	2,5782	35,14	
32,10 ¹	9,4304	2,798	29,67	29,79±0,17
32,10 ²	9,4207	2,818	29,91	

¹Experimento 1

²Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIC.8.- Colágeno no hidrolizado para distintas concentraciones de sustrato proteico (So)

So (g/l)	Colágeno inicial (mg/g)*	Colágeno en fase sólida (mg/g)*	Porcentaje de colágeno no hidrolizado (%)	Porcentaje de colágeno no hidrolizado Media±Desviación estándar (%)
3,45 ¹	67,91	21,39	31,50	31,54±0,06
3,45 ²	67,91	21,45	31,59	
10,48 ¹	67,91	27,71	40,80	40,41±0,56
10,48 ²	67,91	27,17	40,01	
17,45 ¹	67,91	29,32	43,17	43,26±0,11
17,45 ²	67,91	29,43	43,34	
24,76 ¹	67,91	39,72	58,49	53,78±1,56
24,76 ²	67,91	38,22	56,28	
32,10 ¹	67,91	40,37	59,45	59,37±0,11
32,10 ²	67,91	40,26	59,28	

¹Experimento 1

²Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIC.9.- Lípidos recuperados para distintas concentraciones de sustrato proteico (So)

So (g/l)	Lípidos iniciales (g)	Lípidos separados (g)	Porcentaje de lípidos recuperados (%)	Porcentaje de lípidos recuperados Media±Desviación estándar (%)
3,45 ¹	3,8341	3,8222	99,69	99,75±0,09
3,45 ²	3,8296	3,8227	99,82	
10,48 ¹	11,6234	11,5051	98,98	99,06±0,11
10,48 ²	11,4065	11,3087	99,14	
17,45 ¹	18,9404	15,81	83,49	82,62±1,23
17,45 ²	18,9921	15,5271	81,76	
24,76 ¹	26,5697	17,1525	64,56	63,96±0,84
24,76 ²	26,6374	16,8771	63,36	
32,10 ¹	34,3392	18,7661	54,65	55,34±0,97
32,10 ²	34,1137	19,1112	56,02	

¹Experimento 1²Experimento 2

Tabla IIC.10.- Distribución en porcentaje de ácidos grasos en lípidos recuperados para distintas concentraciones de sustrato proteico (So)

Ácido	So = 3,45 g/l			So = 10,48 g/l			So = 17,45 g/l			So = 24,76 g/l			So = 32,10 g/l		
	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación
C14:0	4,48	4,34	4,41±0,10	4,32	4,18	4,25±0,10	4,20	4,26	4,23±0,04	4,26	4,14	4,20±0,08	4,58	4,45	4,52±0,09
C14:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C15:0	0,20	0,18	0,19±0,01	0,24	0,22	0,23±0,01	0,22	0,22	0,22±0,00	0,45	0,43	0,44±0,01	0,60	0,58	0,59±0,01
C15:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C16:0	24,89	25,48	25,19±0,42	24,69	25,43	25,06±0,52	25,56	25,16	25,36±0,28	24,89	25,65	25,27±0,54	24,79	25,52	25,16±0,52
C16:1	0,19	0,17	0,18±0,01	0,23	0,21	0,22±0,01	0,19	0,21	0,20±0,01	0,44	0,42	0,43±0,01	0,49	0,47	0,48±0,01
C17:0	3,60	3,49	3,55±0,08	3,63	3,54	3,59±0,06	3,60	3,54	3,57±0,04	3,52	3,41	3,47±0,08	3,92	3,80	3,86±0,08
C17:1	0,31	0,29	0,30±0,01	0,36	0,34	0,35±0,01	0,32	0,34	0,33±0,01	0,56	0,54	0,55±0,01	0,62	0,60	0,61±0,01
C18:0	12,77	13,15	12,96±0,27	12,95	13,30	13,13±0,25	13,1	12,86	12,98±0,17	12,00	12,41	12,21±0,29	12,55	12,90	12,73±0,25
C18:1n9c+t	24,21	24,82	24,52±0,43	24,01	24,75	24,38±0,52	24,38	24,72	24,55±0,24	24,11	23,45	23,78±0,47	22,67	21,95	22,31±0,51
C18:2n6c+t	11,11	10,87	10,99±0,17	10,86	10,47	10,67±0,28	10,48	10,77	10,63±0,21	11,15	10,77	10,96±0,27	11,08	10,77	10,93±0,22
C18:3n3	3,10	3,00	3,05±0,07	3,10	3,01	3,06±0,06	3,12	3,02	3,07±0,07	3,25	3,35	3,30±0,07	3,05	3,15	3,10±0,07
C18:3n6	0,15	0,13	0,14±0,01	0,18	0,16	0,17±0,01	0,23	0,23	0,23±0,00	0,36	0,38	0,37±0,01	0,43	0,45	0,44±0,01
C20:0	0,32	0,30	0,31±0,01	0,37	0,35	0,36±0,01	0,35	0,33	0,34±0,01	0,56	0,58	0,57±0,01	0,61	0,63	0,62±0,01
C20:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C20:2	1,76	1,82	1,79±0,04	1,66	1,70	1,68±0,03	1,77	1,85	1,81±0,06	2,01	2,07	2,04±0,04	1,91	1,98	1,95±0,05
C20:3n6+c21:0	3,92	3,81	3,87±0,08	3,82	3,71	3,77±0,08	3,82	3,94	3,89±0,08	3,49	3,40	3,45±0,06	3,65	3,76	3,71±0,08
C20:3n3	4,87	4,74	4,81±0,09	4,80	4,68	4,74±0,08	4,76	4,91	4,83±0,11	5,04	4,90	4,97±0,10	5,02	4,88	4,95±0,10
C20:4n6	3,79	3,68	3,74±0,08	3,84	3,72	3,78±0,08	3,69	3,81	3,76±0,08	3,93	4,04	3,99±0,08	3,33	3,43	3,38±0,07
TOTAL	100	100		100	100		100	100		100	100		100	100	

1* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 1

2* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 2

**D) INFLUENCIA DE LA RELACIÓN
CONCENTRACIÓN DE
ALCALASA/CONCENTRACIÓN DE
SUSTRATO**

Tabla IID.1.- GH obtenido con Alcalasa (Eo/So=0,05 UA/g, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,15	0,20	1,43	0,18	0,20	1,43
0,72	0,40	2,86	0,88	0,30	2,15
1,57	0,60	4,29	1,72	0,40	2,87
2,42	0,80	5,72	3,10	0,50	3,58
3,37	1,00	7,15	4,70	0,60	4,30
5,25	1,10	7,87	5,42	0,70	5,02
6,87	1,20	8,58	6,13	0,80	5,73
8,47	1,30	9,3	6,13	0,90	6,45
10,88	1,40	10,01	9,42	1,00	7,16
13,75	1,50	10,73	11,35	1,10	7,88
19,12	1,60	11,44	13,15	1,20	8,60
24,22	1,70	12,16	15,05	1,30	9,31
29,87	1,80	12,87	17,10	1,40	10,03
34,73	1,90	13,59	19,73	1,50	10,75
41,17	2,00	14,3	22,28	1,60	11,46
52,55	2,10	15,02	25,23	1,70	12,18
60,95	2,20	15,73	28,53	1,80	12,90
75,28	2,30	16,45	32,08	1,90	13,61
96,05	2,40	17,16	36,03	2,00	14,33
126,35	2,50	17,88	39,67	2,10	15,05
157,48	2,60	18,59	43,75	2,20	15,76
182,52	2,70	19,31	49,12	2,30	16,48
217,47	2,80	20,02	52,87	2,40	17,20
			60,30	2,50	17,91
			73,02	2,60	18,63
			108,38	2,70	19,35
			127,27	2,80	20,06
			155,85	2,90	20,78
			182,12	3,00	21,49
			225,02	3,10	22,21

Tabla IID.2.- GH obtenido con Alcalasa (Eo/So=0,09 UA/g, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,27	0,20	0,80	0,78	0,10	0,40
0,42	0,30	1,19	1,13	0,20	0,79
0,58	0,40	1,59	1,25	0,30	1,19
0,78	0,50	1,99	1,37	0,40	1,59
0,98	0,60	2,39	1,48	0,50	1,99
1,35	0,70	2,79	1,62	0,60	2,38
1,48	0,80	3,18	1,98	0,80	3,18
1,7	0,90	3,58	2,47	1,00	3,97
1,97	1,00	3,98	2,85	1,20	4,77
2,37	1,10	4,38	3,55	1,40	5,56
2,92	1,20	4,78	4,5	1,60	6,36
3,65	1,30	5,17	5,7	1,80	7,15
4,48	1,40	5,57	6,63	2,00	7,95
5,38	1,60	6,37	7,73	2,20	8,74
6,98	1,80	7,16	8,83	2,40	9,54
8,28	2,00	7,96	9,92	2,60	10,33
10,4	2,20	8,76	11,13	2,80	11,12
12,55	2,30	9,15	13,2	3,00	11,92
14,75	2,60	10,35	15,63	3,20	12,71
16,85	2,80	11,14	17,68	3,40	13,51
19,05	3,00	11,94	19,67	3,60	14,30
22,65	3,40	13,53	22,25	3,80	15,10
25,32	3,60	14,33	26,35	4,00	15,89
28,73	3,80	15,13	28,75	4,10	16,29
32,18	4,00	15,92	31,77	4,20	16,69
37,63	4,20	16,72	36,92	4,40	17,48
43,35	4,30	17,12	42,53	4,60	18,28
49,37	4,40	17,51	48,35	4,70	18,67
55,35	4,50	17,91	55,55	4,80	19,07
63,25	4,60	18,31	63,2	4,90	19,47
69,55	4,70	18,71	72,23	5,00	19,87
75,4	4,80	19,11	79,73	5,10	20,26
82,75	4,90	19,50	86,62	5,20	20,66
90,37	5,00	19,90	93,75	5,30	21,06
100,2	5,10	20,30	101,92	5,40	21,45
123,85	5,20	20,70	132,37	5,50	21,85
143,72	5,30	21,10	160,38	5,60	22,25
167,48	5,40	21,49	214,27	5,80	23,04
192,22	5,50	21,89	237,22	5,85	23,24
211,15	5,60	22,29			
248,17	5,70	22,69			

Tabla IID.3.- GH obtenido con Alcalasa (Eo/So=0,11 UA/g, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,15	0,30	1,53	0,45	0,40	2,04
0,33	0,50	2,55	0,95	0,60	3,06
0,60	0,70	3,57	2,78	0,80	4,09
0,85	0,90	4,58	3,47	1,00	5,11
1,17	1,10	5,60	3,75	1,10	5,62
1,42	1,20	6,11	4,10	1,20	6,13
1,62	1,30	6,62	4,43	1,30	6,64
1,82	1,40	7,13	4,80	1,40	7,15
2,20	1,50	7,64	5,35	1,50	7,66
2,65	1,60	8,15	5,95	1,60	8,17
2,97	1,70	8,66	6,52	1,70	8,68
3,30	1,80	9,17	7,45	1,80	9,19
3,98	1,90	9,67	8,42	1,90	9,70
4,73	2,00	10,19	9,50	2,00	10,21
5,65	2,10	10,70	10,52	2,10	10,72
6,78	2,20	11,21	11,47	2,20	11,23
8,22	2,30	11,72	12,67	2,30	11,74
9,98	2,40	12,22	13,85	2,40	12,26
11,70	2,50	12,73	15,20	2,50	12,77
14,18	2,60	13,24	16,82	2,60	13,28
16,55	2,70	13,75	18,37	2,70	13,79
19,92	2,80	14,26	20,25	2,80	14,30
23,65	2,90	14,77	22,52	2,90	14,81
27,93	3,00	15,28	25,28	3,00	15,32
36,68	3,10	15,79	28,38	3,10	15,83
40,20	3,20	16,30	31,25	3,20	16,34
46,45	3,30	16,81	35,55	3,30	16,85
50,32	3,40	17,32	39,78	3,40	17,36
55,38	3,50	17,83	45,22	3,50	17,87
65,33	3,60	18,34	51,12	3,60	18,38
75,35	3,70	18,85	57,38	3,70	18,89
86,55	3,80	19,36	70,12	3,80	19,40
99,70	3,90	19,86	79,25	3,90	19,92
109,18	4,00	20,37	87,52	4,00	20,43
124,37	4,10	20,88	98,37	4,10	20,94
139,80	4,20	21,39	113,45	4,20	21,45
151,03	4,30	21,90	141,55	4,30	21,96
165,48	4,40	22,41	159,25	4,40	22,47
185,67	4,50	22,92	179,30	4,50	22,98
210,35	4,60	23,43	205,28	4,60	23,49
239,37	4,70	23,94	239,32	4,70	24,00

Tabla IID.4.- GH obtenido con Alcalasa (Eo/So=0,16 UA/g, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	0,30	2,15	0,32	0,20	1,43
0,45	0,50	3,58	0,75	0,40	2,86
0,82	0,70	5,01	1,47	0,50	3,57
1,22	0,90	6,45	2,40	0,60	4,29
1,78	1,10	7,88	3,03	0,70	5,00
2,92	1,30	9,31	4,13	0,80	5,72
4,17	1,50	10,75	5,03	0,90	6,43
5,58	1,60	11,46	6,03	1,00	7,14
7,25	1,70	12,18	7,45	1,10	7,86
9,23	1,80	12,89	8,32	1,20	8,57
11,57	1,90	13,61	9,50	1,30	9,29
14,53	2,00	14,33	10,63	1,40	10,00
17,65	2,10	15,04	12,13	1,50	10,72
21,73	2,20	15,76	13,73	1,60	11,43
25,30	2,30	16,48	15,95	1,70	12,14
29,13	2,40	17,19	18,03	1,80	12,86
33,65	2,50	17,91	19,95	1,90	13,57
39,48	2,60	18,62	21,28	2,00	14,29
45,50	2,70	19,34	23,37	2,10	15,00
52,78	2,80	20,06	25,40	2,20	15,72
58,63	2,90	20,77	27,82	2,30	16,43
66,23	3,00	21,49	30,47	2,40	17,15
73,48	3,10	22,21	33,42	2,50	17,86
81,68	3,20	22,92	36,33	2,60	18,57
96,22	3,30	23,64	40,62	2,70	19,29
107,75	3,40	24,36	44,18	2,80	20,00
123,73	3,50	25,07	47,47	2,90	20,72
152,17	3,60	25,79	52,67	3,00	21,43
182,25	3,70	26,50	56,82	3,10	22,15
214,17	3,80	27,22	72,02	3,20	22,86
242,38	3,90	27,94	85,28	3,30	23,57
			108,62	3,40	24,29
			146,78	3,50	25,00
			160,37	3,60	25,72
			214,67	3,70	26,43
			240,55	3,80	27,15

Tabla IID.5.- GH obtenido con Alcalasa (Eo/So=0,21 UA/g, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,17	0,30	2,15	0,25	0,20	1,43
0,25	0,50	3,58	0,43	0,40	2,86
0,52	0,70	5,01	0,82	0,50	3,57
0,83	0,80	5,73	1,50	0,60	4,28
1,17	0,90	6,44	1,92	0,70	5,00
1,47	1,00	7,16	2,33	0,80	5,71
1,85	1,10	7,87	2,85	0,90	6,43
2,35	1,20	8,59	3,33	1,00	7,14
2,87	1,30	9,31	4,12	1,10	7,85
3,53	1,40	10,02	5,02	1,20	8,56
4,37	1,50	10,74	5,75	1,30	9,28
4,85	1,60	11,45	7,43	1,40	9,99
5,97	1,70	12,17	8,68	1,50	10,71
7,57	1,80	12,89	9,60	1,60	11,42
7,92	1,90	13,60	10,65	1,70	12,14
8,50	2,00	14,32	11,20	1,80	12,85
9,83	2,10	15,03	13,67	1,90	13,56
11,22	2,20	15,75	15,22	2,00	14,28
14,15	2,30	16,46	16,83	2,10	14,99
16,08	2,40	17,18	19,50	2,20	15,71
18,98	2,50	17,90	21,75	2,30	16,42
22,28	2,60	18,61	25,43	2,40	17,13
24,80	2,70	19,33	28,12	2,50	17,85
27,50	2,80	20,04	31,25	2,60	18,56
31,15	2,90	20,76	35,08	2,70	19,28
35,02	3,00	21,48	37,08	2,80	19,99
41,08	3,10	22,19	43,95	2,90	20,70
46,33	3,20	22,91	48,88	3,00	21,42
53,73	3,30	23,62	55,33	3,10	22,13
62,30	3,40	24,34	57,63	3,20	22,84
79,43	3,50	25,05	69,50	3,30	23,56
100,37	3,60	25,77	77,37	3,40	24,27
115,03	3,70	26,49	83,90	3,50	24,99
145,28	3,80	27,20	91,23	3,60	25,70
204,25	3,90	27,92	102,85	3,70	26,41
			119,22	3,80	27,13
			139,73	3,90	27,84
			163,20	4,00	28,56
			195,17	4,10	29,27
			221,20	4,20	29,98

Tabla IID.6.- GH obtenido con Alcalasa (Eo/So=0,27 UA/g, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	0,40	2,86	0,20	0,30	2,15
0,40	0,60	4,29	0,47	0,50	3,58
0,63	0,80	5,72	0,72	0,70	5,01
0,98	0,90	6,44	1,02	0,90	6,44
1,47	1,10	7,87	1,35	1,10	7,87
1,83	1,30	9,30	1,73	1,30	9,31
2,35	1,40	10,02	1,98	1,50	10,74
2,77	1,50	10,73	2,53	1,60	11,45
3,68	1,60	11,45	2,90	1,70	12,17
4,28	1,70	12,16	3,25	1,80	12,88
6,43	1,90	13,59	3,67	1,90	13,60
7,37	2,00	14,31	4,70	2,10	15,03
8,38	2,10	15,02	5,23	2,20	15,75
9,47	2,20	15,74	6,07	2,30	16,46
10,82	2,30	16,45	7,75	2,40	17,18
13,10	2,40	17,17	8,28	2,50	17,90
15,17	2,50	17,89	10,37	2,60	18,61
17,68	2,60	18,60	12,77	2,70	19,33
19,02	2,70	19,32	15,38	2,80	20,04
23,12	2,80	20,03	18,92	2,90	20,76
26,28	2,90	20,75	22,47	3,00	21,47
29,33	3,00	21,46	27,32	3,10	22,19
35,78	3,10	22,18	32,23	3,20	22,91
38,85	3,20	22,89	37,13	3,30	23,62
43,15	3,30	23,61	41,18	3,40	24,34
48,73	3,40	24,32	47,15	3,50	25,05
54,52	3,50	25,04	53,45	3,60	25,77
59,95	3,60	25,76	59,52	3,70	26,49
67,03	3,70	26,47	67,42	3,80	27,20
82,83	3,80	27,19	83,20	3,90	27,92
100,73	3,90	27,90	94,50	4,00	28,63
115,92	4,00	28,62	106,28	4,10	29,35
127,83	4,10	29,33	135,13	4,20	30,06
140,72	4,20	30,05	155,18	4,30	30,78
151,32	4,30	30,76	170,72	4,40	31,50
167,08	4,40	31,48	203,73	4,50	32,21
182,70	4,50	32,19	238,25	4,60	32,93
192,45	4,60	32,91			
242,23	4,70	33,62			

Tabla IID.7.- GH obtenido con Alcalasa (Eo/So=0,81 UA/g, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,15	0,10	3,54	0,12	0,10	3,54
0,33	0,20	7,08	0,30	0,20	7,09
0,57	0,30	10,62	0,48	0,30	10,63
0,75	0,40	14,15	0,63	0,40	14,17
1,58	0,50	17,69	1,42	0,50	17,17
3,25	0,60	21,23	3,68	0,60	21,26
10,03	0,70	24,77	8,07	0,70	24,80
20,50	0,80	28,31	18,62	0,80	28,34
48,52	0,90	31,85	56,58	0,90	31,89
93,65	1,00	35,39	126,95	1,00	35,43
138,97	1,10	38,93	193,30	1,10	38,97
255,35	1,20	42,46	255,18	1,20	42,51

Tabla IID.8.- Residuo no solubilizado para distintas relaciones Alcalasa/ sustrato proteico (Eo/So)

Eo/So (UA/g)	Residuo seco inicial (g)	Residuo seco final (g)	Porcentaje de Residuo no solubilizado (%)	Porcentaje de Residuo no solubilizado Media±Desviación estándar (%)
0,05 ¹	27,5372	12,844	46,64	45,13±2,14
0,05 ²	27,48	11,9851	43,61	
0,09 ¹	49,5555	15,581	31,44	31,60±0,22
0,09 ²	49,832	15,8221	31,75	
0,11 ¹	38,6553	9,001	23,29	24,24±1,35
0,11 ²	27,5227	6,9361	25,20	
0,16 ¹	27,4857	5,7719	21,00	21,53±0,74
0,16 ²	27,5607	6,0782	22,05	
0,21 ¹	27,5045	4,2231	15,35	15,33±0,03
0,21 ²	27,5795	4,2231	15,31	
0,27 ¹	27,5209	1,0178	7,30	7,27±0,05
0,27 ²	27,5055	1,9891	7,23	
0,81 ¹	5,564	0,1137	2,04	1,84±0,28
0,81 ²	5,5573	0,0912	1,64	

¹Experimento 1

²Experimento 2

Tabla IID.9.- Proteína solubilizada para distintas relaciones Alcalasa/ sustrato proteico (Eo/So)

Eo/So (UA/g)	Proteína inicial (g)*	Proteína solubilizada (g)*	Porcentaje de proteína solubilizada (%)	Porcentaje de proteína solubilizada Media±Desviación estándar (%)
0,05 ¹	5,2403	1,6923	32,29	32,64±0,50
0,05 ²	5,2294	1,7254	32,99	
0,09 ¹	9,4304	2,798	29,67	29,79±0,17
0,09 ²	9,4207	2,818	29,91	
0,11 ¹	7,3549	2,6261	35,71	35,42±0,40
0,11 ²	7,3374	2,5782	35,14	
0,16 ¹	5,2305	2,3626	45,17	45,03±0,16
0,16 ²	5,2448	2,3543	44,89	
0,21 ¹	5,2341	2,6232	50,12	49,93±0,26
0,21 ²	5,2484	2,6108	49,74	
0,27 ¹	3,2099	2,0625	64,25	64,42±0,24
0,27 ²	3,15	2,0346	64,59	
0,81 ¹	1,0588	0,9151	86,43	86,68±0,35
0,81 ²	1,0576	0,9193	86,92	

¹Experimento 1

²Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IID.10.- Colágeno no hidrolizado para distintas relaciones Alcalasa/ sustrato proteico (Eo/So)

Eo/So (UA/g)	Colágeno inicial (mg/g)*	Colágeno en fase sólida (mg/g)*	Porcentaje de colágeno no hidrolizado (%)	Porcentaje de colágeno no hidrolizado Media±Desviación estándar (%)
0,05 ¹	67,91	46,44	68,38	68,17±0,30
0,05 ²	67,91	46,15	67,96	
0,09 ¹	67,91	40,37	59,45	59,37±0,11
0,09 ²	67,91	40,26	59,28	
0,11 ¹	67,91	36,6	53,89	53,85±0,06
0,11 ²	67,91	36,54	53,81	
0,16 ¹	67,91	29,32	43,17	43,26±0,11
0,16 ²	67,91	29,22	43,03	
0,21 ¹	67,91	23,38	34,43	34,39±0,05
0,21 ²	67,91	23,33	34,35	
0,27 ¹	67,91	21,39	31,50	31,54±0,06
0,27 ²	67,91	21,45	31,59	
0,81 ¹	67,91	18,47	27,20	27,03±0,24
0,81 ²	67,91	18,24	26,86	

¹ Experimento 1

² Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IID.11.- Lípidos recuperados para distintas relaciones Alcalasa/ sustrato proteico (Eo/So)

Eo/So (UA/g)	Lípidos iniciales (g)	Lípidos separados (g)	Porcentaje de lípidos recuperados (%)	Porcentaje de lípidos recuperados Media±Desviación estándar (%)
0,05 ¹	18,9759	5,9711	31,47	37,53±3,58
0,05 ²	18,9365	8,2557	43,60	
0,09 ¹	34,087	19,6341	57,60	58,09±0,70
0,09 ²	34,1487	20,0055	58,58	
0,11 ¹	26,6675	17,4251	65,34	66,42±1,53
0,11 ²	26,6331	17,9771	67,50	
0,16 ¹	18,9404	15,8135	83,49	82,62±1,23
0,16 ²	18,9921	15,5271	81,76	
0,21 ¹	18,9533	17,9121	94,51	94,04±0,65
0,21 ²	19,005	17,7855	93,58	
0,27 ¹	11,6234	11,5051	98,98	99,06±0,11
0,27 ²	11,4065	11,3087	99,14	
0,81 ¹	3,8341	3,8222	99,69	99,75±0,09
0,81 ²	3,8296	3,8227	99,82	

¹Experimento 1²Experimento 2

Tabla IID.12.- Distribución en porcentaje de ácidos grasos en lípidos recuperados para distintas relaciones Alcalasa/ sustrato proteico (Eo/So)

Ácido	Eo/So = 0,05 UA/g			Eo/So = 0,09 UA/g			Eo/So = 0,11 UA/g			Eo/So = 0,16 UA/g		
	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación
C14:0	4,32	4,19	4,26±0,09	4,58	4,45	4,52±0,09	4,38	4,25	4,32±0,09	4,20	4,26	4,23±0,04
C14:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C15:0	0,30	0,28	0,29±0,01	0,60	0,58	0,59±0,01	0,20	0,18	0,19±0,01	0,22	0,22	0,22±0,00
C15:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C16:0	25,06	25,74	25,40±0,48	24,79	25,52	25,16±0,52	24,82	25,56	25,19±0,52	25,56	25,16	25,36±0,28
C16:1	0,31	0,27	0,29±0,03	0,49	0,47	0,48±0,01	0,29	0,27	0,28±0,01	0,19	0,21	0,20±0,01
C17:0	3,25	3,15	3,20±0,07	3,92	3,80	3,86±0,08	3,28	3,20	3,24±0,06	3,60	3,54	3,57±0,04
C17:1	0,53	0,51	0,52±0,01	0,62	0,60	0,61±0,01	0,51	0,51	0,51±0,01	0,32	0,34	0,33±0,01
C18:0	12,50	12,84	12,67±0,24	12,55	12,90	12,73±0,25	12,54	12,86	12,70±0,23	13,1	12,86	12,98±0,17
C18:1n9c+t	24,20	24,78	24,49±0,41	22,67	21,95	22,31±0,51	24,55	24,82	24,79±0,19	24,38	24,72	24,55±0,24
C18:2n6c+t	11,02	10,54	10,78±0,34	11,08	10,77	10,93±0,22	11,00	10,64	10,82±0,25	10,48	10,77	10,63±0,21
C18:3n3	3,06	3,00	3,03±0,04	3,05	3,15	3,10±0,07	3,06	3,00	3,03±0,04	3,12	3,02	3,07±0,07
C18:3n6	0,40	0,38	0,39±0,01	0,43	0,45	0,44±0,01	0,39	0,38	0,38±0,01	0,23	0,23	0,23±0,00
C20:0	0,43	0,41	0,42±0,01	0,61	0,63	0,62±0,01	0,41	0,39	0,40±0,01	0,35	0,33	0,34±0,01
C20:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C20:2	1,74	1,68	1,71±0,04	1,91	1,98	1,95±0,05	1,69	1,63	1,66±0,04	1,77	1,85	1,81±0,06
C20:3n6+c21:0	4,00	3,86	3,93±0,10	3,65	3,76	3,71±0,08	3,89	3,77	3,83±0,08	3,82	3,94	3,89±0,08
C20:3n3	4,88	4,76	4,82±0,08	5,02	4,88	4,95±0,10	4,78	4,67	4,73±0,08	4,76	4,91	4,83±0,11
C20:4n6	3,86	3,74	3,80±0,08	3,33	3,43	3,38±0,07	3,99	3,87	3,93±0,08	3,69	3,81	3,76±0,08
TOTAL	100	100		100	100		100	100		100	100	

1* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 1

2* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 2

Tabla IID.12.- Distribución en porcentaje de ácidos grasos en lípidos recuperados para distintas relaciones Alcalasa/ sustrato proteico (Eo/So)

(continuación)

Ácido	Eo/So = 0,21 UA/g			Eo/So = 0,27 UA/g			Eo/So = 0,81 UA/g		
	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación
C14:0	4,34	4,21	4,28±0,09	4,28	4,17	4,23±0,08	4,48	4,34	4,41±0,10
C14:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C15:0	0,25	0,23	0,24±0,01	0,24	0,22	0,23±0,01	0,20	0,18	0,19±0,01
C15:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C16:0	25,10	25,80	25,45±0,49	25,00	25,70	25,35±0,49	24,89	25,48	25,19±0,42
C16:1	0,52	0,50	0,51±0,01	0,56	0,54	0,55±0,01	0,19	0,17	0,18±0,01
C17:0	3,13	3,04	3,09±0,06	3,54	3,44	3,49±0,07	3,60	3,49	3,55±0,08
C17:1	0,50	0,50	0,50±0,01	0,54	0,52	0,53±0,01	0,31	0,29	0,30±0,01
C18:0	12,54	12,96	12,75±0,30	12,54	12,70	12,62±0,11	12,77	13,15	12,96±0,27
C18:1n9c+t	24,30	24,92	24,61±0,44	24,20	24,80	24,50±0,42	24,21	24,82	24,52±0,43
C18:2n6c+t	10,92	10,54	10,73±0,27	10,65	10,35	10,50±0,21	11,11	10,87	10,99±0,17
C18:3n3	3,07	3,00	3,04±0,05	3,17	3,10	3,14±0,05	3,10	3,00	3,05±0,07
C18:3n6	0,35	0,35	0,35±0,01	0,23	0,23	0,23±0,00	0,15	0,13	0,14±0,01
C20:0	0,52	0,50	0,51±0,01	0,29	0,26	0,28±0,02	0,32	0,30	0,31±0,01
C20:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C20:2	1,83	1,78	1,81±0,04	1,66	1,72	1,69±0,04	1,76	1,82	1,79±0,04
C20:3n6+c21:0	3,78	3,68	3,73±0,07	3,98	3,86	3,92±0,08	3,92	3,81	3,87±0,08
C20:3n3	4,68	4,56	4,62±0,08	4,91	4,77	4,84±0,10	4,87	4,74	4,81±0,09
C20:4n6	3,83	3,72	3,78±0,08	3,96	3,83	3,90±0,09	3,79	3,68	3,74±0,08
TOTAL	100	100		100	100		100	100	

1* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 1

2* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 2

E) INFLUENCIA DEL pH

Tabla IIE.1.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=50°C, pH=7,0)

Experimento 1 (NaOH 2,39 N)			Experimento 2 (NaOH 2,39 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,15	0,10	1,37	0,20	0,20	2,71
0,42	0,30	4,10	0,35	0,40	5,42
0,98	0,40	5,46	0,52	0,50	6,78
1,98	0,50	6,83	1,20	0,60	8,13
2,88	0,55	7,51	2,98	0,70	9,49
3,82	0,60	8,19	3,92	0,75	10,17
5,52	0,65	8,87	5,63	0,80	10,85
7,12	0,70	9,56	7,15	0,85	11,52
8,98	0,75	10,24	8,97	0,90	12,20
10,25	0,80	10,92	10,28	0,95	12,88
14,55	0,85	11,60	14,63	1,00	13,56
17,05	0,90	12,29	16,22	1,05	14,24
22,28	0,95	12,97	23,17	1,10	14,91
29,02	1,00	13,65	28,18	1,15	15,59
39,42	1,05	14,33	37,35	1,20	16,27
49,20	1,10	15,02	47,38	1,25	16,95
93,12	1,20	16,38	95,28	1,30	17,63
108,22	1,25	17,06	108,22	1,35	18,30
148,18	1,35	18,43	138,27	1,40	18,98
169,27	1,40	19,11	175,17	1,45	19,66
218,20	1,50	20,48	211,22	1,50	20,34
251,15	1,55	21,16	239,32	1,55	21,01

Tabla IIE.2.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=50°C, pH=7,5)

Experimento 1 (NaOH 2,39 N)			Experimento 2 (NaOH 2,39 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,85	0,20	1,68	0,62	0,20	1,68
1,25	0,40	3,37	0,92	0,40	3,37
1,65	0,60	5,05	1,30	0,60	5,05
2,30	0,80	6,73	1,63	0,80	6,73
2,85	1,00	8,42	2,37	1,00	8,42
3,53	1,10	9,26	2,87	1,20	10,10
4,68	1,20	10,10	3,65	1,30	10,94
5,95	1,30	10,94	4,75	1,40	11,78
7,22	1,40	11,78	6,12	1,50	12,63
8,98	1,50	12,63	7,38	1,60	13,47
10,47	1,60	13,47	9,32	1,70	14,31
14,43	1,70	14,31	10,80	1,80	15,15
18,52	1,80	15,15	14,63	1,90	15,99
26,15	2,00	16,83	18,63	2,00	16,83
37,80	2,10	17,68	27,32	2,10	17,68
48,20	2,20	18,52	38,47	2,20	18,52
59,47	2,30	19,36	49,03	2,30	19,36
75,37	2,40	20,20	59,30	2,40	20,20
92,68	2,50	21,04	75,37	2,50	21,04
107,47	2,60	21,88	90,48	2,60	21,88
143,28	2,80	23,57	109,30	2,70	22,73
168,35	2,85	23,99	143,28	2,80	23,57
192,02	2,90	24,41	170,52	2,90	24,41
220,35	2,95	24,83	197,35	3,00	25,25
251,32	3,00	25,25	217,45	3,05	25,67
			241,82	3,10	26,09

Tabla IIE.3.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=50 °C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	0,30	2,15	0,32	0,20	1,43
0,45	0,50	3,58	0,75	0,40	2,86
0,82	0,70	5,01	1,47	0,50	3,57
1,22	0,90	6,45	2,40	0,60	4,29
1,78	1,10	7,88	3,03	0,70	5,00
2,92	1,30	9,31	4,13	0,80	5,72
4,17	1,50	10,75	5,03	0,90	6,43
5,58	1,60	11,46	6,03	1,00	7,14
7,25	1,70	12,18	7,45	1,10	7,86
9,23	1,80	12,89	8,32	1,20	8,57
11,57	1,90	13,61	9,50	1,30	9,29
14,53	2,00	14,33	10,63	1,40	10,00
17,65	2,10	15,04	12,13	1,50	10,72
21,73	2,20	15,76	13,73	1,60	11,43
25,30	2,30	16,48	15,95	1,70	12,14
29,13	2,40	17,19	18,03	1,80	12,86
33,65	2,50	17,91	19,95	1,90	13,57
39,48	2,60	18,62	21,28	2,00	14,29
45,50	2,70	19,34	23,37	2,10	15,00
52,78	2,80	20,06	25,40	2,20	15,72
58,63	2,90	20,77	27,82	2,30	16,43
66,23	3,00	21,49	30,47	2,40	17,15
73,48	3,10	22,21	33,42	2,50	17,86
81,68	3,20	22,92	36,33	2,60	18,57
96,22	3,30	23,64	40,62	2,70	19,29
107,75	3,40	24,36	44,18	2,80	20,00
123,73	3,50	25,07	47,47	2,90	20,72
152,17	3,60	25,79	52,67	3,00	21,43
182,25	3,70	26,50	56,82	3,10	22,15
214,17	3,80	27,22	72,02	3,20	22,86
242,38	3,90	27,94	85,28	3,30	23,57
			108,62	3,40	24,29
			146,78	3,50	25,00
			160,37	3,60	25,72
			214,67	3,70	26,43
			240,55	3,80	27,15

Tabla IIE.4.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=50°C, pH=8,5)

Experimento 1 (NaOH 2,39 N)			Experimento 2 (NaOH 2,39 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,17	0,30	1,88	0,17	0,20	1,25
0,29	0,70	4,37	0,30	0,40	2,49
0,40	1,00	6,24	0,43	0,60	3,74
0,62	1,40	8,73	0,65	0,80	4,99
0,98	1,80	11,23	0,98	1,00	6,24
1,62	2,20	13,72	1,65	1,20	7,45
1,98	2,40	14,97	2,65	1,40	8,73
2,47	2,60	16,22	3,73	1,60	9,98
2,95	2,70	16,84	4,82	1,70	10,60
3,63	2,80	17,47	5,98	1,90	11,85
4,77	2,90	18,09	7,15	2,10	13,10
5,95	3,00	18,72	8,20	2,30	14,35
6,98	3,10	19,34	10,23	2,50	15,59
8,20	3,20	19,96	12,42	2,70	16,84
10,07	3,30	20,59	17,37	2,90	18,09
12,25	3,40	21,21	22,40	3,10	19,34
17,32	3,50	21,84	26,60	3,30	20,58
21,40	3,60	22,46	33,07	3,50	21,83
26,52	3,70	23,08	39,32	3,70	23,08
32,23	3,80	23,71	49,28	3,80	23,70
39,28	3,90	24,33	59,25	3,90	24,33
47,25	4,00	24,95	72,37	4,00	24,95
58,18	4,10	25,58	85,30	4,10	25,57
70,20	4,20	26,20	108,20	4,20	26,20
85,30	4,30	26,83	133,25	4,30	26,82
105,37	4,40	27,45	153,63	4,40	27,44
130,32	4,50	28,07	179,32	4,50	28,07
155,30	4,60	28,70	212,78	4,60	28,69
179,28	4,70	29,32	249,18	4,70	29,32
209,28	4,80	29,95			
239,35	4,90	30,57			

Tabla IIE.5.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=50°C, pH=9,0)

Experimento 1 (NaOH 2,39 N)			Experimento 2 (NaOH 2,39 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,17	0,30	1,82	0,32	0,30	1,82
0,28	0,60	3,63	0,48	0,70	4,25
0,47	1,00	6,04	0,67	1,10	6,68
0,65	1,40	8,46	0,95	1,50	9,11
0,92	1,80	10,88	1,28	1,90	11,54
2,25	2,00	12,09	1,63	2,30	13,97
3,03	2,30	13,90	1,95	2,70	16,40
4,37	2,60	15,72	2,58	3,00	18,22
4,82	2,80	16,92	3,65	3,20	19,43
5,53	3,00	18,13	4,90	3,40	20,65
6,75	3,20	19,34	5,70	3,50	21,25
7,95	3,30	19,95	6,82	3,60	21,86
9,03	3,50	21,16	9,20	3,70	22,47
11,38	3,60	21,76	11,47	3,90	23,68
15,27	3,80	22,97	15,30	4,00	24,29
19,20	4,00	24,18	19,28	4,20	25,50
26,35	4,20	25,39	25,38	4,40	26,72
31,37	4,30	25,99	31,48	4,50	27,33
39,72	4,50	27,20	39,80	4,60	27,93
49,42	4,60	27,80	49,58	4,80	29,15
63,18	4,80	29,01	63,18	5,00	30,36
78,20	5,00	30,22	79,03	5,20	31,58
97,33	5,10	30,83	95,32	5,30	32,18
119,27	5,20	31,43	118,43	5,40	32,79
141,90	5,30	32,04	141,90	5,50	33,40
164,38	5,40	32,64	168,48	5,60	34,01
185,38	5,50	33,24	189,72	5,70	34,61
210,17	5,60	33,85	212,17	5,80	35,22
233,20	5,70	34,45	239,37	5,90	35,83
259,28	5,80	35,06			

Tabla IIE.6.- Residuo no solubilizado para distintos pH

pH	Residuo seco inicial (g)	Residuo seco final (g)	Porcentaje de Residuo no solubilizado (%)	Porcentaje de Residuo no solubilizado Media±Desviación estándar (%)
7,0 ¹	27,4867	6,9912	25,43	25,19±0,35
7,0 ²	27,5478	6,8712	24,94	
7,5 ¹	27,4903	6,5512	23,83	22,99±1,19
7,5 ²	27,6059	6,1142	22,15	
8,0 ¹	27,4857	5,7719	21,00	21,53±0,75
8,0 ²	27,5607	6,0782	22,05	
8,5 ¹	27,5801	4,7812	17,34	17,41±0,10
8,5 ²	27,5774	4,8214	17,48	
9,0 ¹	27,6257	3,9912	14,45	14,42±0,03
9,0 ²	27,651	3,9823	14,40	

¹Experimento 1

²Experimento 2

Tabla IIE.7.- Proteína solubilizada para distintos pH

Eo/So (UA/g)	Proteína inicial (g)*	Proteína solubilizada (g)*	Porcentaje de proteína solubilizada (%)	Porcentaje de proteína solubilizada Media±Desviación estándar (%)
7,0 ¹	5,2572	2,1137	40,21	40,30±0,14
7,0 ²	5,262	2,1260	40,40	
7,5 ¹	5,2485	2,1585	41,13	41,05±0,11
7,5 ²	5,248	2,1504	40,98	
8,0 ¹	5,2305	2,3626	45,17	45,03±0,20
8,0 ²	5,2448	2,3543	44,89	
8,5 ¹	5,2534	3,0953	58,92	58,65±0,38
8,5 ²	5,2314	3,0545	58,39	
9,0 ¹	5,2423	3,1319	59,74	59,30±0,62
9,0 ²	5,2307	3,0790	58,86	

¹Experimento 1²Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIE.8.- Colágeno no hidrolizado para distintos pH

Eo/So (UA/g)	Colágeno inicial (mg/g)*	Colágeno en fase sólida (mg/g)*	Porcentaje de colágeno no hidrolizado (%)	Porcentaje de colágeno no hidrolizado Media±Desviación estándar (%)
7,0 ¹	67,91	33,0600	48,68	48,18±0,71
7,0 ²	67,91	32,3800	47,68	
7,5 ¹	67,91	30,3900	44,75	45,41±0,94
7,5 ²	67,91	31,2900	46,08	
8,0 ¹	67,91	29,3200	43,17	43,10±0,10
8,0 ²	67,91	29,2200	43,03	
8,5 ¹	67,91	28,8600	42,50	42,18±0,45
8,5 ²	67,91	28,4300	41,86	
9,0 ¹	67,91	26,1400	38,49	38,18±0,44
9,0 ²	67,91	25,7200	37,87	

¹Experimento 1

²Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIE.9.- Lípidos recuperados para distintos pH

Eo/So (UA/g)	Lípidos iniciales (g)	Lípidos separados (g)	Porcentaje de lípidos recuperados (%)	Porcentaje de lípidos recuperados Media±Desviación estándar (%)
7,0 ¹	18,8411	13,0911	69,48	70,73±1,76
7,0 ²	18,9832	13,6633	71,98	
7,5 ¹	18,9436	14,2113	75,02	74,87±0,21
7,5 ²	19,0232	14,2141	74,72	
8,0 ¹	18,9404	15,81	83,49	82,62±1,23
8,0 ²	18,9921	15,5271	81,76	
8,5 ¹	19,0055	16,2311	85,40	86,54±1,61
8,5 ²	19,0036	16,6612	87,67	
9,0 ¹	19,0369	17,0011	89,31	89,57±0,38
9,0 ²	19,0543	17,1201	89,85	

¹Experimento 1²Experimento 2

Tabla III.10.- Distribución en porcentaje de ácidos grasos en lípidos recuperados para distintos pH

Ácido	pH = 7,0			pH = 7,5			pH = 8,0			pH = 8,5			pH = 9,0		
	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación
C14:0	4,20	4,08	4,14±0,08	4,15	4,04	4,10±0,08	4,38	4,24	4,31±0,10	4,33	4,21	4,27±0,08	4,11	4,24	4,18±0,09
C14:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C15:0	0,43	0,45	0,44±0,01	0,41	0,43	0,42±0,01	0,39	0,39	0,39±0,01	0,26	0,28	0,27±0,01	0,19	0,17	0,18±0,01
C15:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C16:0	25,09	25,84	25,47±0,53	25,41	26,10	25,76±0,49	25,01	25,75	25,38±0,52	25,40	26,16	25,78±0,54	25,42	26,16	25,79±0,52
C16:1	0,30	0,32	0,31±0,01	0,24	0,26	0,25±0,01	0,28	0,28	0,28±0,01	0,17	0,15	0,16±0,01	0,22	0,20	0,21±0,01
C17:0	4,01	3,90	3,96±0,08	3,82	3,70	3,76±0,08	3,44	3,38	3,41±0,04	3,82	3,70	3,76±0,08	3,90	3,78	3,84±0,08
C17:1	0,30	0,28	0,29±0,01	0,42	0,40	0,41±0,01	0,50	0,47	0,49±0,02	0,45	0,43	0,44±0,01	0,35	0,33	0,34±0,01
C18:0	12,45	12,78	12,62±0,23	12,95	13,20	13,08±0,18	12,70	12,26	12,48±0,31	12,95	12,55	12,75±0,28	13,37	12,95	13,16±0,30
C18:1n9c+t	24,49	23,71	24,10±0,55	24,72	24,01	24,37±0,50	25,15	24,29	24,72±0,61	25,18	24,50	24,84±0,48	24,58	24,00	24,29±0,41
C18:2n6c+t	10,28	9,99	10,14±0,21	10,45	10,09	10,27±0,25	10,65	11,00	10,83±0,25	10,27	10,60	10,44±0,23	10,27	10,57	10,42±0,21
C18:3n3	3,02	3,10	3,06±0,06	3,02	3,10	3,06±0,06	2,85	2,77	2,81±0,06	3,18	3,27	3,23±0,06	3,09	3,18	3,14±0,06
C18:3n6	0,43	0,41	0,42±0,01	0,41	0,39	0,40±0,01	0,29	0,33	0,31±0,03	0,20	0,22	0,21±0,01	0,36	0,34	0,35±0,01
C20:0	0,48	0,46	0,47±0,01	0,41	0,43	0,42±0,01	0,52	0,50	0,51±0,01	0,32	0,30	0,31±0,01	0,40	0,38	0,39±0,01
C20:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C20:2	2,13	2,20	2,17±0,05	1,90	1,95	1,93±0,04	1,95	2,01	1,98±0,04	1,77	1,83	1,80±0,04	1,75	1,68	1,72±0,05
C20:3n6+c21:0	3,82	3,95	3,89±0,09	3,29	3,40	3,35±0,08	3,52	3,60	3,56±0,06	3,48	3,56	3,52±0,06	3,48	3,37	3,43±0,08
C20:3n3	4,74	4,89	4,82±0,11	4,54	4,67	4,61±0,09	4,71	4,95	4,83±0,17	4,38	4,52	4,45±0,10	4,41	4,54	4,53±0,09
C20:4n6	3,76	3,63	3,70±0,09	3,75	3,86	3,81±0,08	3,66	3,76	3,53±0,07	3,64	3,75	3,70±0,08	4,02	3,90	3,96±0,08
TOTAL	100	100		100	100		100	100		100	100		100	100	

1* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 1

2* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 2

F) INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Tabla IIF.1.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=40 °C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,39 N)			Experimento 2 (NaOH 2,39 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,10	0,30	2,15	0,10	0,30	2,15
0,23	0,80	5,75	0,22	0,70	5,03
0,42	1,20	8,62	0,38	1,10	7,90
0,78	1,60	11,50	0,95	1,50	10,77
1,48	2,00	14,37	1,28	1,70	12,21
1,82	2,20	15,81	1,58	1,90	13,64
2,33	2,30	16,53	2,35	2,10	15,08
3,67	2,40	17,24	3,65	2,20	15,80
4,17	2,50	17,96	4,22	2,30	16,51
5,17	2,60	18,68	5,25	2,40	17,23
6,83	2,70	19,40	6,85	2,50	17,95
7,27	2,80	20,12	7,30	2,60	18,67
9,30	2,90	20,84	9,30	2,70	19,39
11,75	3,00	21,56	11,75	2,80	20,10
14,33	3,10	22,27	14,33	2,90	20,82
17,30	3,20	22,99	18,35	3,00	21,54
20,28	3,30	23,71	20,28	3,10	22,26
24,73	3,40	24,43	24,73	3,20	22,98
29,52	3,50	25,15	29,58	3,30	23,69
35,75	3,60	25,87	35,75	3,40	24,41
44,33	3,70	26,59	44,35	3,50	25,13
59,30	3,80	27,30	59,47	3,60	25,85
70,28	3,90	28,02	72,62	3,70	26,57
80,75	4,00	28,74	78,25	3,80	27,28
96,53	4,10	29,46	100,53	3,90	28,00
109,37	4,20	30,18	111,37	4,00	28,72
142,25	4,30	30,90	138,28	4,10	29,44
169,30	4,40	31,62	148,30	4,20	30,16
212,48	4,50	32,33	155,25	4,30	30,87
236,20	4,60	33,05	168,25	4,40	31,59
			177,42	4,50	32,31
			208,90	4,60	33,03
			232,38	4,70	33,75
			229,35	4,80	34,46

Tabla IIF.2.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=45 °C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,20	0,20	1,48	0,17	0,20	1,48
0,40	0,50	3,71	0,38	0,50	3,71
0,67	0,70	5,19	0,63	0,70	5,19
1,15	0,90	6,68	0,98	0,90	6,67
1,53	1,10	8,16	1,40	1,10	8,16
1,98	1,30	9,64	1,78	1,30	9,64
2,40	1,40	10,39	2,37	1,50	11,12
2,85	1,50	11,13	3,08	1,70	12,61
3,45	1,60	11,87	3,65	1,80	13,35
3,98	1,70	12,61	4,07	1,90	14,09
4,55	1,80	13,35	4,70	2,00	14,83
5,08	1,90	14,09	5,25	2,10	15,57
5,97	2,00	14,84	5,93	2,20	16,31
6,68	2,10	15,58	6,53	2,30	17,06
7,77	2,20	16,32	7,68	2,40	17,80
8,88	2,30	17,06	8,78	2,50	18,54
9,98	2,40	17,80	9,92	2,60	19,28
11,57	2,50	18,55	11,20	2,70	20,02
13,95	2,60	19,29	13,47	2,80	20,76
16,43	2,70	20,03	15,73	2,90	21,51
19,75	2,80	20,77	17,83	3,00	22,25
25,93	2,90	21,51	24,18	3,10	22,99
31,80	3,00	22,26	31,15	3,20	23,73
38,42	3,10	23,00	39,07	3,30	24,47
48,55	3,20	23,74	49,47	3,40	25,21
59,78	3,30	24,48	59,98	3,50	25,96
72,52	3,40	25,22	75,30	3,60	26,70
85,90	3,50	25,96	92,82	3,70	27,44
105,28	3,60	26,71	119,67	3,80	28,18
125,38	3,70	27,45	149,20	3,90	28,92
155,38	3,80	28,19	179,18	4,00	29,66
181,25	3,90	28,93	213,27	4,10	30,41
217,37	4,00	29,67	245,27	4,20	31,15
250,13	4,10	30,42			

Tabla IIF.3.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=50 °C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,25	0,30	2,15	0,32	0,20	1,43
0,45	0,50	3,58	0,75	0,40	2,86
0,82	0,70	5,01	1,47	0,50	3,57
1,22	0,90	6,45	2,40	0,60	4,29
1,78	1,10	7,88	3,03	0,70	5,00
2,92	1,30	9,31	4,13	0,80	5,72
4,17	1,50	10,75	5,03	0,90	6,43
5,58	1,60	11,46	6,03	1,00	7,14
7,25	1,70	12,18	7,45	1,10	7,86
9,23	1,80	12,89	8,32	1,20	8,57
11,57	1,90	13,61	9,50	1,30	9,29
14,53	2,00	14,33	10,63	1,40	10,00
17,65	2,10	15,04	12,13	1,50	10,72
21,73	2,20	15,76	13,73	1,60	11,43
25,30	2,30	16,48	15,95	1,70	12,14
29,13	2,40	17,19	18,03	1,80	12,86
33,65	2,50	17,91	19,95	1,90	13,57
39,48	2,60	18,62	21,28	2,00	14,29
45,50	2,70	19,34	23,37	2,10	15,00
52,78	2,80	20,06	25,40	2,20	15,72
58,63	2,90	20,77	27,82	2,30	16,43
66,23	3,00	21,49	30,47	2,40	17,15
73,48	3,10	22,21	33,42	2,50	17,86
81,68	3,20	22,92	36,33	2,60	18,57
96,22	3,30	23,64	40,62	2,70	19,29
107,75	3,40	24,36	44,18	2,80	20,00
123,73	3,50	25,07	47,47	2,90	20,72
152,17	3,60	25,79	52,67	3,00	21,43
182,25	3,70	26,50	56,82	3,10	22,15
214,17	3,80	27,22	72,02	3,20	22,86
242,38	3,90	27,94	85,28	3,30	23,57
			108,62	3,40	24,29
			146,78	3,50	25,00
			160,37	3,60	25,72
			214,67	3,70	26,43
			240,55	3,80	27,15

Tabla IIF.4.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=55 °C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,23	0,10	0,70	0,25	0,20	1,41
0,38	0,30	2,10	0,43	0,40	2,81
0,62	0,50	3,50	0,98	0,60	4,22
0,97	0,70	4,90	1,57	0,80	5,62
1,37	0,90	6,30	1,75	0,90	6,32
2,30	1,10	7,70	2,22	1,00	7,03
2,82	1,20	8,40	2,78	1,10	7,73
3,27	1,30	9,10	3,58	1,20	8,43
3,85	1,40	9,80	4,27	1,30	9,13
4,45	1,50	10,50	6,38	1,50	10,54
5,35	1,60	11,20	7,48	1,60	11,24
5,47	1,70	11,89	8,57	1,70	11,94
7,65	1,80	12,59	9,57	1,80	12,65
8,75	1,90	13,29	14,38	2,00	14,05
9,95	2,00	13,99	18,45	2,10	14,75
12,20	2,10	14,69	28,20	2,40	16,86
15,38	2,20	15,39	36,37	2,50	17,56
18,60	2,30	16,09	46,22	2,60	18,27
22,68	2,40	16,79	56,48	2,80	19,67
28,37	2,60	18,19	69,20	2,90	20,37
36,63	2,70	18,89	89,28	3,10	21,78
46,20	2,80	19,59	115,23	3,20	22,48
58,27	2,90	20,29	179,93	3,50	24,59
75,28	3,05	21,34	239,00	3,70	25,99
91,75	3,20	22,39			
132,27	3,40	23,79			
165,45	3,50	24,49			
229,30	3,70	25,89			

Tabla IIF.5.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=60 °C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)			Experimento 2 (NaOH 2,52 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,17	0,20	1,37	0,20	0,20	1,37
0,32	0,40	2,73	0,30	0,40	2,74
0,52	0,60	4,10	0,43	0,60	4,11
0,77	0,80	5,47	0,62	0,80	5,48
1,13	1,00	6,83	1,10	1,00	6,84
1,47	1,20	8,20	1,48	1,20	8,21
1,87	1,40	9,56	1,97	1,40	9,58
2,42	1,60	10,93	2,65	1,60	10,95
2,98	1,80	12,30	3,48	1,80	12,32
3,75	2,00	13,66	4,97	1,90	13,01
4,28	2,10	14,35	5,68	2,00	13,69
5,32	2,20	15,03	6,75	2,10	14,37
6,37	2,30	15,71	7,85	2,20	15,06
7,43	2,40	16,40	8,92	2,30	15,74
8,52	2,50	17,08	9,98	2,40	16,43
9,62	2,60	17,76	11,28	2,50	17,11
10,70	2,70	18,44	14,32	2,60	17,80
11,82	2,80	19,13	17,40	2,70	18,48
14,30	2,90	19,81	22,62	2,80	19,17
17,37	3,00	20,49	29,82	2,90	19,85
20,42	3,10	21,18	39,32	3,00	20,53
25,30	3,20	21,86	49,42	3,10	21,22
30,05	3,22	22,00	65,35	3,12	21,36
37,47	3,24	22,13	157,43	3,14	21,49
49,33	3,26	22,27	224,20	3,16	21,63
88,20	3,28	22,41			
119,15	3,30	22,54			
202,30	3,32	22,68			

Tabla IIF.6.- Residuo no solubilizado para distintas temperaturas

T (°C)	Residuo seco inicial (g)	Residuo seco final (g)	Porcentaje de Residuo no solubilizado (%)	Porcentaje de Residuo no solubilizado Media±Desviación estándar (%)
40 ¹	27,5484	3,0912	11,22	11,26±0,06
40 ²	27,5900	3,1192	11,31	
45 ¹	27,4807	4,1101	14,96	14,93±0,04
45 ²	27,4897	4,0978	14,91	
50 ¹	27,4857	5,7719	21,00	21,53±0,75
50 ²	27,5607	6,0782	22,05	
55 ¹	27,6414	6,2733	22,70	22,69±0,01
55 ²	27,5306	6,2478	22,69	
60 ¹	27,5462	7,0911	25,74	25,60±0,20
60 ²	27,4915	6,9998	25,46	

¹Experimento 1

²Experimento 2

Tabla IIF.7.- Proteína solubilizada para distintas temperaturas

T (°C)	Proteína inicial (g)*	Proteína solubilizada (g)*	Porcentaje de proteína solubilizada (%)	Porcentaje de proteína solubilizada Media±Desviación estándar (%)
40 ¹	5,242	2,4436	46,62	46,76±0,20
40 ²	5,2316	2,4534	46,90	
45 ¹	5,2602	2,4001	45,63	45,82±0,27
45 ²	5,2391	2,4108	46,02	
50 ¹	5,2305	2,3622	45,16	45,03±0,20
50 ²	5,2448	2,3539	44,88	
55 ¹	5,2296	2,1626	41,35	41,62±0,38
55 ²	5,2313	2,1911	41,88	
60 ¹	5,2425	2,1178	40,40	40,83±0,62
60 ²	5,2504	2,1667	41,27	

¹Experimento 1²Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIF.8.- Colágeno no hidrolizado para distintas temperaturas

T (°C)	Colágeno inicial (mg/g)*	Colágeno en fase sólida (mg/g)*	Porcentaje de colágeno no hidrolizado (%)	Porcentaje de colágeno no hidrolizado Media±Desviación estándar (%)
40 ¹	67,91	24,0700	35,44	35,94±0,70
40 ²	67,91	24,7400	36,43	
45 ¹	67,91	26,6000	39,17	39,23±0,08
45 ²	67,91	26,6800	39,29	
50 ¹	67,91	29,3200	43,17	43,10±0,10
50 ²	67,91	29,2200	43,03	
55 ¹	67,91	29,4800	43,41	43,17±0,34
55 ²	67,91	29,1500	42,92	
60 ¹	67,91	32,7700	48,26	47,74±0,73
60 ²	67,91	32,0700	47,22	

¹Experimento 1

²Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIF.9.- Lípidos recuperados para distintas temperaturas

T (°C)	Lípidos iniciales (g)	Lípidos separados (g)	Porcentaje de lípidos recuperados (%)	Porcentaje de lípidos recuperados Media±Desviación estándar (%)
40 ¹	18,9836	18,92	99,68	97,56±3,00
40 ²	19,0123	18,1451	95,44	
45 ¹	18,9369	16,9211	89,36	87,12±3,17
45 ²	18,9432	16,0781	84,88	
50 ¹	18,9404	15,81	83,49	82,62±1,23
50 ²	18,9921	15,5271	81,76	
55 ¹	19,0477	15,9711	83,85	82,05±2,55
55 ²	18,9713	15,2234	80,24	
60 ¹	18,9821	12,0911	63,70	68,86±3,06
60 ²	18,9444	12,8871	68,03	

¹Experimento 1²Experimento 2

Tabla IIF.10.- Distribución en porcentaje de ácidos grasos en lípidos recuperados para distintas temperaturas

Ácido	40°C			45°C			50°C			55°C			60°C		
	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación
C14:0	4,13	4,24	4,19±0,08	4,17	4,30	4,24±0,09	4,38	4,24	4,31±0,10	4,26	4,39	4,33±0,09	4,18	4,31	4,25±0,09
C14:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C15:0	0,29	0,31	0,30±0,01	0,19	0,21	0,20±0,01	0,39	0,39	0,39±0,01	0,30	0,28	0,29±0,01	0,28	0,26	0,27±0,01
C15:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C16:0	25,75	24,94	25,35±0,57	26,15	25,39	25,77±0,52	25,01	25,75	25,38±0,52	25,62	24,89	25,26±0,52	25,92	25,17	25,55±0,53
C16:1	0,32	0,30	0,31±0,01	0,30	0,28	0,29±0,01	0,28	0,28	0,28±0,01	0,21	0,23	0,22±0,01	0,29	0,27	0,28±0,01
C17:0	3,57	3,45	3,51±0,08	3,84	3,95	3,90±0,08	3,44	3,38	3,41±0,04	3,87	3,98	3,93±0,08	3,85	3,97	3,91±0,08
C17:1	0,42	0,44	0,43±0,01	0,35	0,37	0,36±0,01	0,50	0,47	0,49±0,02	0,34	0,36	0,35±0,01	0,41	0,43	0,42±0,01
C18:0	13,37	12,96	13,17±0,29	12,54	12,90	12,72±0,25	12,70	12,26	12,48±0,31	12,90	13,25	13,08±0,25	12,88	13,25	13,07±0,26
C18:1n9c+t	24,58	25,40	24,99±0,58	24,56	25,26	24,91±0,49	25,15	24,29	24,72±0,61	24,29	24,99	24,64±0,49	24,00	24,71	24,36±0,50
C18:2n6c+t	10,04	10,34	10,19±0,21	10,56	10,24	10,40±0,23	10,65	11,00	10,83±0,25	10,59	10,28	10,44±0,22	10,57	10,27	10,42±0,21
C18:3n3	3,11	3,19	3,15±0,06	3,24	3,16	3,20±0,06	2,85	2,77	2,81±0,06	3,27	3,19	3,23±0,06	3,25	3,17	3,21±0,06
C18:3n6	0,28	0,30	0,29±0,01	0,23	0,25	0,24±0,01	0,29	0,33	0,31±0,03	0,22	0,24	0,23±0,01	0,27	0,25	0,26±0,01
C20:0	0,33	0,35	0,34±0,01	0,41	0,43	0,42±0,01	0,52	0,50	0,51±0,01	0,38	0,40	0,39±0,01	0,31	0,29	0,30±0,01
C20:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C20:2	1,74	1,69	1,72±0,04	1,94	2,00	1,97±0,04	1,95	2,01	1,98±0,04	1,77	1,83	1,80±0,04	1,98	1,92	1,95±0,04
C20:3n6+c21:0	3,22	3,32	3,27±0,07	3,37	3,27	3,32±0,07	3,52	3,60	3,56±0,06	3,46	3,57	3,52±0,08	3,45	3,54	3,50±0,06
C20:3n3	4,94	4,79	4,87±0,11	4,99	4,85	4,92±0,10	4,71	4,95	4,83±0,17	5,03	4,87	4,95±0,11	5,01	4,85	4,93±0,11
C20:4n6	3,98	3,86	3,92±0,08	3,18	3,09	3,14±0,06	3,66	3,76	3,53±0,07	3,40	3,28	3,34±0,08	3,36	3,27	3,32±0,06
TOTAL	100	100		100	100		100	100		100	100		100	100	

1* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 1

2* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 2

G) ADICIÓN EXTRA DE SUSTRATO

Tabla IIG.1.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=50 °C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,52 N)						Experimento 2 (NaOH 2,52 N)					
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t*	V _{NaOH} * (ml)	GH* (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t*	V _{NaOH} * (ml)	GH* (%)
0,00	0,00	0,00	60,80	3,15	21,31	0,00	0,00	0,00	60,50	3,20	21,64
0,60	0,50	3,38	70,20	3,25	21,98	0,62	0,50	3,38	67,83	3,25	21,98
0,80	0,60	4,06	77,50	3,30	22,32	1,23	0,80	5,41	76,17	3,30	22,32
1,20	0,80	5,41	86,00	3,35	22,66	1,83	1,00	6,76	85,50	3,35	22,66
1,80	1,00	6,76	95,90	3,45	23,34	2,48	1,15	7,78	90,25	3,40	23,00
2,00	1,10	7,44	105,20	3,50	23,67	2,93	1,25	8,46	100,53	3,45	23,34
2,90	1,30	8,79	114,40	3,55	24,01	3,83	1,40	9,47	113,13	3,55	24,01
3,80	1,40	9,47	128,60	3,60	24,69	4,47	1,50	10,15	125,55	3,60	24,35
4,80	1,60	10,15	140,50	3,65	25,03	5,57	1,60	10,82	145,20	3,70	25,03
5,90	1,70	11,50	161,50	3,75	25,70	6,52	1,70	11,50	170,03	3,80	25,70
6,60	1,80	12,18	195,20	3,90	26,38	7,60	1,80	12,18	195,72	3,90	26,38
8,00	1,90	12,85	231,20	4,00	27,39	8,55	1,90	12,85	220,23	4,00	27,06
9,20	1,95	13,19				10,08	2,00	13,53	238,10	4,10	27,73
10,70	2,00	13,53				10,45	2,05	13,87			
12,90	2,10	14,20				12,83	2,15	14,54			
14,50	2,25	15,22				14,22	2,20	14,88			
17,50	2,35	15,90				16,05	2,30	15,56			
20,10	2,45	16,57				18,32	2,40	16,23			
23,00	2,55	17,25				20,83	2,45	16,57			
27,50	2,65	17,92				26,40	2,60	17,59			
36,80	2,80	18,94				28,93	2,65	17,92			
39,10	2,85	19,28				32,67	2,75	18,60			
42,20	2,90	19,62				35,97	2,80	18,94			
50,10	3,00	20,29				40,80	2,90	19,62			
59,50	3,10	20,97				47,42	3,00	20,29			
						52,18	3,05	20,63			
						58,80	3,15	21,31			

* Adición extra de 4,36 g/l de sustrato al reactor

H) ADICIÓN EXTRA DE ALCALASA

Tabla III.1.- GH obtenido con Alcalasa (So=17,45 g/l, Eo=2,81 UA/l, T=50 °C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,39 N)						Experimento 2 (NaOH 2,39 N)					
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t* (min)	V _{NaOH} * (ml)	GH* (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t* (min)	V _{NaOH} * (ml)	GH* (%)
0,00	0,00	0,00	60,00	3,00	20,29	0,00	0,00	0,00	60,00	3,00	20,38
0,23	0,30	2,03	60,25	3,30	22,32	0,22	0,20	1,36	60,25	3,30	22,42
0,33	0,50	3,38	60,98	3,50	23,67	0,32	0,40	2,72	60,98	3,50	23,77
0,65	0,70	4,73	61,32	3,70	25,03	0,45	0,60	4,08	61,38	3,70	25,13
0,78	0,80	5,41	62,65	3,80	25,70	0,82	0,80	5,43	62,52	3,90	26,49
0,98	0,90	6,09	62,98	3,90	26,38	1,23	1,00	6,79	63,32	4,00	27,17
1,23	1,00	6,76	64,48	4,00	27,06	1,63	1,20	8,15	64,48	4,10	27,85
1,42	1,10	7,44	66,07	4,10	27,73	2,60	1,40	9,51	66,07	4,20	28,53
1,63	1,20	8,12	69,98	4,20	28,41	3,98	1,60	10,87	69,98	4,30	29,21
1,87	1,30	8,79	73,97	4,30	29,09	4,98	1,70	11,55	74,45	4,40	29,89
2,57	1,40	9,47	79,82	4,40	29,76	5,90	1,80	12,23	81,82	4,50	30,57
3,00	1,50	10,15	84,20	4,50	30,44	8,25	1,90	12,91	89,32	4,60	31,25
3,92	1,60	10,82	96,58	4,60	31,11	11,35	2,00	13,59	102,37	4,70	31,93
4,95	1,70	11,50	111,62	4,70	31,79	13,47	2,10	14,26	114,63	4,80	32,60
6,17	1,80	12,18	132,35	4,80	32,47	17,50	2,20	14,94	132,35	4,90	33,28
8,20	1,90	12,85	176,02	4,90	33,14	19,98	2,30	15,62	145,68	4,95	33,62
10,35	2,00	13,53	230,25	5,00	33,82	24,47	2,40	16,30	179,02	5,00	33,96
13,47	2,10	14,20				29,75	2,50	16,98	205,28	5,05	34,30
17,50	2,20	14,88				39,58	2,60	17,66	249,48	5,10	34,64
19,98	2,30	15,56				45,53	2,70	18,34			
24,47	2,40	16,23				48,35	2,80	19,02			
29,75	2,50	16,91				55,85	2,90	19,70			
37,20	2,60	17,59									
42,32	2,70	18,26									
49,52	2,80	18,94									
59,18	2,90	19,62									

* Adición extra de 2,81 UA/l de Alcalasa al reactor

**ANEXO III: HIDRÓLISIS CON
LIPASAS**

A) INFLUENCIA DEL TIPO DE LIPASA

Tabla IIIA.1.- GH obtenido con Lipozyme CALB ($S_o'=63,14$ g/l, $E_o'=52,44$ kLU/l, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 0,20 N)			Experimento 2 (NaOH 0,21N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,02	0,40	1,23	2,75	0,50	1,53
27,32	0,80	2,46	28,22	1,00	3,07
81,15	1,20	3,69	88,12	1,40	4,29
153,28	1,60	4,92	161,28	1,80	5,52
239,92	2,00	6,15	235,57	2,10	6,44

Tabla IIIA.2.- GH obtenido con Lipozyme TL 100L (So'=63,14 g/l, Eo'=52,44 kLU/l, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 0,20 N)			Experimento 2 (NaOH 0,20 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,48	1,50	4,61	0,47	2,00	6,15
1,35	2,50	7,68	1,42	3,00	9,22
2,17	3,50	10,75	2,97	4,00	12,29
4,92	4,50	13,82	5,13	5,00	15,36
15,92	6,00	18,43	16,50	6,00	18,44
40,28	6,50	19,96	41,02	6,50	19,97
75,97	7,00	21,50	77,38	7,00	21,51
105,17	7,50	23,03	110,55	7,50	23,04
149,30	8,00	24,57	152,17	8,00	24,58
177,07	8,50	26,10	179,63	8,50	26,12
200,32	9,00	27,64	205,52	9,00	27,65
249,23	9,50	29,17	252,78	9,50	29,19

Tabla IIIA.3.- GH obtenido con Novocor ADL ($S_o'=63,14$ g/l, $E_o'=52,44$ kLU/l, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 0,21 N)			Experimento 2 (NaOH 0,21 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,63	0,50	1,53	2,08	0,50	1,53
10,48	0,90	2,76	14,03	1,00	3,06
34,37	1,30	3,99	27,25	1,30	3,98
77,75	1,70	5,22	56,42	1,60	4,89
119,32	2,10	6,44	87,30	1,90	5,81
168,35	2,50	7,67	159,17	2,20	6,73
245,50	2,90	8,90	228,25	2,50	7,65

Tabla IIIA.4.- GH obtenido con Novozym 51032 (So'=63,14 g/l, Eo'=52,44 kLU/l, T=50°C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 0,20 N)			Experimento 2 (NaOH 0,20 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,33	2,50	7,29	0,45	2,00	5,83
1,17	4,00	11,67	1,50	3,50	10,20
4,17	5,50	16,05	4,25	5,00	14,58
7,13	7,00	20,42	8,02	6,50	18,95
11,05	8,50	24,80	11,30	8,00	23,32
18,45	10,00	29,17	17,67	9,50	27,70
27,33	11,50	33,55	28,05	11,00	32,07
40,48	13,00	37,93	38,77	12,50	36,44
62,95	14,50	42,30	57,15	14,00	40,82
98,73	16,00	46,68	82,80	15,50	45,19
143,25	17,50	51,05	119,55	17,00	49,56
185,48	19,00	55,43	158,20	18,50	53,94
235,30	20,50	59,81	188,18	20,00	58,31
			227,38	21,50	62,68

Tabla IIIA.5.- GH obtenido con Resinase TL ($S_o'=63,14$ g/l, $E_o'=52,44$ kLU/l, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 0,20 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,00
0,40	2,50	7,27	0,50	0,20	7,26
1,22	4,00	11,63	5,58	0,60	21,79
3,25	5,50	15,99	14,25	1,00	36,32
4,62	7,00	20,35	27,95	1,20	43,59
5,95	8,50	24,71	56,37	1,50	54,48
8,12	10,00	29,07	84,50	1,80	65,38
10,40	11,50	33,43	115,47	2,00	72,64
12,97	13,00	37,79	150,28	2,20	79,91
17,33	14,50	42,15	200,20	2,40	87,17
21,67	16,00	46,51	235,62	2,50	90,80
33,47	17,50	50,87			
45,33	19,00	55,23			
52,52	20,50	59,60			
63,40	22,00	63,96			
91,97	23,50	68,32			
110,95	25,00	72,68			
137,65	26,50	77,04			
163,67	28,00	81,40			
195,68	29,50	85,76			
238,27	31,00	90,12			

Tabla IIIA.6.- Residuo no solubilizado para distintos tipos de lipasas

Lipasa	Residuo seco inicial (g)	Residuo seco final (g)	Porcentaje de Residuo no solubilizado (%)	Porcentaje de Residuo no solubilizado Media±Desviación estándar (%)
Resinase HT ¹	27,5783	5,7203	20,74	20,54±0,29
Resinase HT ²	27,4868	5,5881	20,33	
Novozym 51032 ¹	27,4813	10,2347	37,24	37,76±0,73
Novozym 51032 ²	27,4987	10,5241	38,27	
Lipozyme TL 100L ¹	24,4949	10,8194	44,17	42,23±2,74
Lipozyme TL 100L ²	27,4806	11,0741	40,30	
Novocor ADL ¹	27,5126	13,8881	50,48	50,61±0,18
Novocor ADL ²	27,5996	14,0031	50,74	
Lipozyme CALB ¹	27,4805	15,7992	57,49	56,92±0,81
Lipozyme CALB ²	27,5467	15,5214	56,35	

¹Experimento 1

²Experimento 2

Tabla IIIA.7.- Proteína solubilizada para distintos tipos de lipasas

Lipasa	Proteína inicial (g)*	Proteína solubilizada (g)*	Porcentaje de proteína solubilizada (%)	Porcentaje de proteína solubilizada Media±Desviación estándar (%)
Resinase HT ¹	5,2481	2,0978	39,97	39,96±0,07
Resinase HT ²	5,2320	2,0900	39,95	
Novozym 51032 ¹	5,2297	2,0253	38,73	38,80±0,73
Novozym 51032 ²	5,2330	2,0338	38,86	
Lipozyme TL 100L ¹	5,2323	1,9742	37,73	37,86±0,19
Lipozyme TL 100L ²	5,2296	1,9869	37,99	
Novocor ADL ¹	5,2356	1,8462	35,26	35,65±0,55
Novocor ADL ²	5,2522	1,8931	36,04	
Lipozyme CALB ¹	5,2295	1,7823	34,08	34,16±0,11
Lipozyme CALB ²	5,2421	1,7951	34,24	

¹Experimento 1²Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIIA.8.- Colágeno no hidrolizado para distintos tipos de lipasas

Lipasa	Colágeno inicial (mg/g)*	Colágeno en fase sólida (mg/g)*	Porcentaje de colágeno no hidrolizado (%)	Porcentaje de colágeno no hidrolizado Media±Desviación estándar (%)
Resinase HT ¹	67,91	63,52	93,54	93,60±0,09
Resinase HT ²	67,91	63,61	93,67	
Novozym 51032 ¹	67,91	62,35	91,81	93,90±0,12
Novozym 51032 ²	67,91	62,47	91,99	
Lipozyme TL 100L ¹	67,91	63,87	94,05	94,07±0,03
Lipozyme TL 100L ²	67,91	63,9	94,10	
Novocor ADL ¹	67,91	63,47	93,46	93,46±0,01
Novocor ADL ²	67,91	63,47	93,46	
Lipozyme CALB ¹	67,91	63,47	93,46	93,45±0,01
Lipozyme CALB ²	67,91	63,46	93,45	

¹Experimento 1

²Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIIA.9.- Lípidos recuperados para distintos tipos de lipasas

Lipasa	Lípidos iniciales (g)	Lípidos separados (g)	Porcentaje de lípidos recuperados (%)	Porcentaje de lípidos recuperados Media±Desviación estándar (%)
Resinase HT ¹	19,0042	18,175	95,64	95,40±0,33
Resinase HT ²	18,9457	18,0299	95,17	
Novozym 51032 ¹	18,9374	11,2814	59,57	61,42±2,61
Novozym 51032 ²	18,9494	11,987	63,26	
Lipozyme TL 100L ¹	18,9467	9,2382	48,76	48,75±0,01
Lipozyme TL 100L ²	18,9369	9,2345	48,74	
Novocor ADL ¹	18,9589	6,3214	33,34	33,75±0,58
Novocor ADL ²	18,0189	6,1557	34,16	
Lipozyme CALB ¹	18,9368	4,2118	22,24	23,63±1,96
Lipozyme CALB ²	19,9824	4,9974	25,01	

¹Experimento 1²Experimento 2

Tabla IIIA.10.- Cantidad de ácidos grasos obtenida para distintos tipos de lipasas (mg_{ácido}/g_{lípidos})

Ácido	Resinase HT			Novozym 51032			Lipozyme TL 100L			Novocor AD L			Lipozyme CALB		
	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación
C14:0	26,27	27,88	27,08±1,14	18,95	20,04	19,49±0,77	12,92	12,63	12,77±0,21	4,78	4,95	4,86±0,12	3,82	3,86	3,84±0,03
C14:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C15:0	0,95	1,00	0,97±0,04	0,81	0,78	0,80±0,02	0,58	0,56	0,57±0,01	0,25	0,28	0,26±0,03	0,21	0,22	0,21±0,01
C15:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C16:0	198,18	210,26	204,22±8,54	155,68	162,57	159,13±4,87	110,69	105,92	108,30±3,37	31,66	31,66	31,66±0,00	17,93	18,90	18,41±0,68
C16:1	1,07	1,07	1,07±0,00	0,94	0,93	0,93±0,01	0,65	0,64	0,65±0,01	0,24	0,16	0,20±0,05	0,09	0,10	0,10±0,01
C17:0	20,13	21,48	20,80±0,95	16,23	16,53	16,38±0,22	11,39	10,63	11,01±0,54	5,37	5,52	5,45±0,11	4,98	5,23	5,11±0,17
C17:1	3,49	3,31	3,40±0,13	2,20	2,79	2,49±0,42	1,68	1,57	1,63±0,08	0,96	0,97	0,96±0,01	0,83	0,80	0,81±0,02
C18:0	125,99	133,73	129,86±5,47	87,80	89,05	88,42±0,88	52,93	52,68	52,81±0,18	23,48	23,67	23,58±0,13	20,46	19,61	20,04±0,60
C18:1n9c+t	220,06	231,12	225,59±7,82	144,75	155,11	149,93±7,33	81,82	81,60	81,71±0,15	18,03	18,71	18,37±0,49	12,97	14,24	13,61±0,90
C18:2n6c+t	117,48	124,69	121,08±5,10	91,02	86,27	88,64±3,35	64,30	61,60	62,95±1,91	29,34	29,88	29,61±0,38	23,88	25,02	24,45±0,81
C18:3n3	30,02	31,58	30,80±1,10	24,89	25,53	25,21±0,45	14,40	14,47	14,43±0,05	7,06	6,73	6,90±0,24	5,83	5,56	5,69±0,19
C18:3n6	1,12	1,07	1,09±0,04	1,13	0,92	1,03±0,15	0,68	0,54	0,61±0,09	0,25	0,31	0,28±0,05	0,22	0,21	0,21±0,01
C20:0	0,96	1,01	0,99±0,03	0,88	0,83	0,85±0,04	0,57	0,60	0,58±0,02	0,28	0,30	0,29±0,02	0,24	0,23	0,23±0,01
C20:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C20:2	12,72	13,46	13,09±0,53	11,17	11,04	11,10±0,09	7,33	7,26	7,30±0,05	2,64	2,72	2,68±0,06	2,03	1,92	1,97±0,08
C20:3n3	28,66	30,17	29,42±1,07	23,72	22,66	23,19±0,74	16,75	16,39	16,57±0,26	9,24	10,38	9,81±0,81	7,55	8,32	7,94±0,55
C20:3n6+c21:0	42,19	42,29	42,24±0,08	30,97	33,33	32,15±1,67	19,99	19,16	19,57±0,59	10,02	10,31	10,16±0,21	8,68	8,31	8,50±0,26
C20:4n6	23,14	21,78	22,46±0,96	16,00	16,15	16,07±0,11	19,99	19,16	10,21±0,48	10,02	10,31	3,12±0,03	8,68	8,31	2,30±0,06
TOTAL	852,42	895,91	874,16±30,75	637,32	654,63	645,98±12,24	413,91	402,74	408,32±7,90	149,10	152,19	150,64±2,19	113,90	116,55	115,22±1,87

1* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 1

2* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 2

**B) INFLUENCIA DE LA
CONCENTRACIÓN DE RESINASE**

Tabla IIIB.1.- GH obtenido con Resinase ($S_o'=63,14$ g/l, $E_o'=17,50$ kLU/l, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,47	0,20	7,27	0,37	0,10	3,63
6,23	0,40	14,53	5,73	0,30	10,89
18,40	0,60	21,80	16,87	0,50	18,15
38,95	0,80	29,06	33,98	0,70	25,41
59,30	1,00	36,33	63,28	0,90	32,67
105,25	1,20	43,60	99,57	1,10	39,93
169,48	1,40	50,86	160,37	1,30	47,19
247,42	1,50	54,50	235,30	1,50	54,45

Tabla IIIB.2.- GH obtenido con Resinase ($So'=63,14$ g/l, $Eo'=34,95$ kLU/l, $T=50^{\circ}C$, $pH=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,51 N)			Experimento 2 (NaOH 2,51 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,45	0,10	3,69	2,00	0,10	3,69
5,75	0,20	7,38	5,33	0,20	7,38
10,92	0,40	14,76	10,42	0,40	14,77
16,03	0,60	22,15	16,62	0,60	22,15
21,45	0,80	29,53	23,78	0,80	29,54
28,90	0,90	33,22	35,62	1,00	36,92
33,78	1,00	36,91	42,12	1,10	40,61
41,37	1,10	40,60	49,33	1,20	44,30
52,28	1,20	44,29	58,13	1,30	48,00
68,47	1,40	51,68	75,60	1,40	51,69
85,67	1,50	55,37	90,28	1,50	55,38
105,22	1,60	59,06	110,33	1,60	59,07
128,25	1,70	62,75	136,28	1,70	62,76
160,30	1,80	66,44	164,60	1,80	66,46
199,18	1,90	70,13	190,33	1,90	70,15
232,48	2,00	73,82	242,13	2,00	73,84

Tabla IIIB.3.- GH obtenido con Resinase ($S_o'=63,14$ g/l, $E_o'=52,44$ kLU/l, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 0,20 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,40	2,50	7,27	0,50	0,20	7,26
1,22	4,00	11,63	5,58	0,60	21,79
3,25	5,50	15,99	14,25	1,00	36,32
4,62	7,00	20,35	27,95	1,20	43,59
5,95	8,50	24,71	56,37	1,50	54,48
8,12	10,00	29,07	84,50	1,80	65,38
10,40	11,50	33,43	115,47	2,00	72,64
12,97	13,00	37,79	150,28	2,20	79,91
17,33	14,50	42,15	200,20	2,40	87,17
21,67	16,00	46,51	235,62	2,50	90,80
33,47	17,50	50,87			
45,33	19,00	55,23			
52,52	20,50	59,60			
63,40	22,00	63,96			
91,97	23,50	68,32			
110,95	25,00	72,68			
137,65	26,50	77,04			
163,67	28,00	81,40			
195,68	29,50	85,76			
238,27	31,00	90,12			

Tabla IIIB.4.- GH obtenido con Resinase ($So'=63,14$ g/l, $Eo'=69,89$ kLU/l, $T=50^{\circ}C$, $pH=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 0,21 N)			Experimento 2 (NaOH 0,21 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,42	2,20	6,73	0,25	2,00	6,14
1,20	3,80	11,62	1,25	3,80	11,67
3,20	5,40	16,51	3,22	5,60	17,20
4,58	7,00	21,40	5,67	7,40	22,73
5,83	8,60	26,29	10,02	9,20	28,26
7,17	10,20	31,18	17,03	11,00	33,79
10,23	11,80	36,07	23,35	12,80	39,32
12,80	13,40	40,96	34,13	14,60	44,85
17,45	15,00	45,85	45,08	16,40	50,38
22,38	16,60	50,75	55,17	18,20	55,91
33,97	18,20	55,64	67,83	20,00	61,44
45,92	19,80	60,53	79,97	21,80	66,97
53,18	21,40	65,42	95,07	23,60	72,49
65,17	23,00	70,31	108,32	25,40	78,02
79,30	24,60	75,20	135,50	27,20	83,55
93,40	26,20	80,09	156,67	29,00	89,08
107,48	27,80	84,98	179,10	30,80	94,61
133,72	29,40	89,87	198,02	31,20	95,84
155,68	31,00	94,77	216,92	31,50	96,76
178,43	31,50	96,29	235,93	31,80	97,68
199,17	31,90	97,52			
217,18	32,00	97,82			
239,47	32,20	98,43			

Tabla IIIB.5.- GH obtenido con Resinase ($S_o'=63,14$ g/l, $E_o'=87,44$ kLU/l, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 0,21 N)			Experimento 2 (NaOH 0,21 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,23	2,30	7,05	0,30	1,30	3,99
0,98	4,10	12,57	1,15	3,20	9,81
3,03	5,90	18,10	3,18	5,10	15,63
3,78	7,70	23,62	3,80	7,00	21,46
5,28	9,50	29,14	5,17	8,90	27,28
7,38	11,30	34,66	7,22	10,80	33,11
9,47	13,10	40,18	11,20	12,70	38,93
11,37	14,90	45,70	19,67	14,60	44,76
15,35	16,70	51,22	30,15	16,50	50,58
19,75	18,50	56,74	40,13	18,40	56,41
30,20	20,30	62,26	50,35	20,30	62,23
40,18	22,10	67,78	61,48	22,20	68,05
50,52	23,90	73,30	78,02	24,10	73,88
61,35	25,70	78,82	95,08	26,00	79,70
71,85	27,50	84,34	115,15	27,90	85,53
85,95	29,30	89,86	130,78	29,80	91,35
112,65	31,10	95,38	147,78	32,65	100,00
133,67	32,60	99,98			

Tabla IIIB.6.- Residuo no solubilizado para distintas concentraciones de Resinase (Eo')

Eo' (kLU/l)	Residuo seco inicial (g)	Residuo seco final (g)	Porcentaje de Residuo no solubilizado (%)	Porcentaje de Residuo no solubilizado Media±Desviación estándar (%)
17,50 ¹	27,4868	12,9781	47,22	47,02±0,27
17,50 ²	27,5473	12,9014	46,83	
34,95 ¹	27,5978	8,3249	30,17	29,79±0,53
34,95 ²	27,6039	8,1193	29,41	
52,44 ¹	27,5783	5,7203	20,74	20,54±0,29
52,44 ²	27,4868	5,5881	20,33	
69,89 ¹	27,6205	4,2124	15,25	14,76±0,69
69,89 ²	27,4869	3,9221	14,27	
87,44 ¹	27,5301	3,1891	11,58	11,41±0,25
87,44 ²	27,5433	3,0922	11,23	

¹Experimento 1

²Experimento 2

Tabla IIIB.7.- Proteína solubilizada para distintas concentraciones de Resinase (Eo')

Eo' (kLU/l)	Proteína inicial (g)*	Proteína solubilizada (g)*	Porcentaje de proteína solubilizada (%)	Porcentaje de proteína solubilizada Media±Desviación estándar (%)
17,50 ¹	5,2306	1,8641	35,64	35,55±0,12
17,50 ²	5,2348	1,8568	35,47	
34,95 ¹	5,253	1,9977	38,03	38,00±0,05
34,95 ²	5,2427	1,9902	37,96	
52,44 ¹	5,2481	2,0978	39,97	39,96±0,02
52,44 ²	5,232	2,09	39,95	
69,89 ¹	5,2562	2,2171	42,18	42,24±0,09
69,89 ²	5,2308	2,2131	42,31	
87,44 ¹	5,239	2,3333	44,54	44,49±0,07
87,44 ²	5,2415	2,3293	44,44	

¹ Experimento 1² Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIIB.8.- Colágeno no hidrolizado para distintas concentraciones de Resinase (Eo')

Eo' (kLU/l)	Colágeno inicial (mg/g)*	Colágeno en fase sólida (mg/g)*	Porcentaje de colágeno no hidrolizado (%)	Porcentaje de colágeno no hidrolizado Media±Desviación estándar (%)
17,50 ¹	67,91	63,29	93,20	93,41±0,30
17,50 ²	67,91	63,58	93,62	
34,95 ¹	67,91	63,31	93,23	93,26±0,05
34,95 ²	67,91	63,36	93,30	
52,44 ¹	67,91	63,52	93,54	93,60±0,09
52,44 ²	67,91	63,61	93,67	
69,89 ¹	67,91	63,88	94,07	94,05±0,02
69,89 ²	67,91	63,86	94,04	
87,44 ¹	67,91	63,93	94,14	94,05±0,12
87,44 ²	67,91	63,81	93,96	

¹ Experimento 1

² Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIIB.9.- Lípidos recuperados para distintas concentraciones de Resinase (Eo')

Eo' (kLU/l)	Lípidos iniciales (g)	Lípidos separados (g)	Porcentaje de lípidos recuperados (%)	Porcentaje de lípidos recuperados Media±Desviación estándar (%)
17,50 ¹	18,9407	12,2123	64,48	65,00±0,75
17,50 ²	18,9560	12,4221	65,53	
34,95 ¹	19,0218	15,1009	79,39	79,05±0,48
34,95 ²	18,9846	14,9420	78,71	
52,44 ¹	19,0042	18,1750	95,64	95,40±0,33
52,44 ²	18,9457	18,0299	95,17	
69,89 ¹	19,0333	18,3722	96,53	97,07±0,76
69,89 ²	18,9412	18,4881	97,61	
87,44 ¹	18,9710	18,6935	98,54	99,06±0,74
87,44 ²	18,9801	18,9013	99,58	

¹Experimento 1²Experimento 2

Tabla IIIB.10.- Cantidad de ácidos grasos obtenida para distintas concentraciones de Resinase (Eo') (mg_{ácido}/glípidos)

Ácido	Eo' = 17,50 kLU/l			Eo' = 34,95 kLU/l			Eo' = 52,44 kLU/l			Eo' = 69,89 kLU/l			Eo' = 87,44 kLU/l		
	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación
C14:0	18,84	18,71	18,78±0,09	21,69	23,24	22,46±1,09	26,27	27,88	27,08±1,14	28,39	29,74	29,06±0,95	28,96	28,91	28,94±0,04
C14:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C15:0	0,78	0,79	0,79±0,01	0,84	0,84	0,84±0,00	0,95	1,00	0,97±0,04	1,06	1,08	1,07±0,01	1,08	1,08	1,08±0,00
C15:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C16:0	146,20	146,66	146,43±0,338	163,84	164,98	164,41±0,81	198,18	210,26	204,22±8,54	219,34	218,40	218,87±0,67	218,05	221,71	219,88±2,59
C16:1	0,78	0,77	0,77±0,01	0,88	0,89	0,89±0,01	1,07	1,07	1,07±0,00	1,13	1,17	1,15±0,03	1,20	1,16	1,18±0,03
C17:0	15,50	15,43	15,46±0,05	16,86	16,89	16,87±0,02	20,13	21,48	20,80±0,95	22,75	22,36	22,56±0,28	22,79	22,79	22,79±0,00
C17:1	2,77	2,68	2,72±0,06	2,98	2,99	2,99±0,01	3,49	3,31	3,40±0,13	3,57	3,62	3,60±0,03	3,67	3,59	3,63±0,05
C18:0	94,74	97,05	95,90±1,64	104,94	105,67	105,30±0,52	125,99	133,73	129,86±5,47	142,78	143,97	143,38±0,84	141,26	140,85	141,05±0,29
C18:1n9c+t	160,93	159,94	160,44±0,70	171,49	172,70	172,10±0,86	220,06	231,12	225,59±7,82	258,25	256,35	257,30±1,34	264,74	254,42	259,58±7,30
C18:2n6c+t	89,52	87,57	88,54±1,38	99,03	98,79	98,91±0,17	117,48	124,69	121,08±5,10	123,53	127,70	125,62±2,95	127,68	130,51	129,09±2,00
C18:3n3	27,81	27,98	27,90±0,12	29,15	29,29	29,22±0,09	30,02	31,58	30,80±1,10	31,37	32,32	31,84±0,67	32,19	32,11	32,15±0,06
C18:3n6	0,37	0,37	0,37±0,00	0,56	0,61	0,59±0,03	1,12	1,07	1,09±0,04	1,21	1,20	1,20±0,01	1,21	1,21	1,21±0,00
C20:0	0,67	0,68	0,68±0,01	0,80	0,78	0,79±0,01	0,96	1,01	0,99±0,03	1,03	1,09	1,06±0,04	1,08	1,09	1,08±0,01
C20:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C20:2	9,37	9,34	9,36±0,02	10,70	10,35	10,53±0,25	12,72	13,46	13,09±0,53	14,30	13,98	14,14±0,23	14,53	14,19	14,36±0,24
C20:3n3	21,26	20,93	21,10±0,23	24,43	23,05	23,74±0,98	28,66	30,17	29,42±1,07	32,49	32,31	32,40±0,13	32,99	32,28	32,63±0,50
C20:3n6+c21:0	34,93	34,69	34,81±0,17	38,07	38,30	38,19±0,16	42,19	42,29	42,24±0,08	42,97	44,18	43,58±0,86	43,42	44,17	43,79±0,53
C20:4n6	15,48	15,91	15,69±0,30	17,36	17,05	17,20±0,22	23,14	21,78	22,46±0,96	24,22	23,87	24,05±0,25	23,81	24,89	24,35±0,76
TOTAL	639,96	639,51	639,74±0,32	703,62	706,42	705,02±1,98	852,42	895,91	874,16±30,75	948,42	953,34	950,88±3,48	958,65	954,95	956,80±2,62

1* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 1

2* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 2

**C) INFLUENCIA DE LA
CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO
LIPÍDICO**

Tabla IIIC.1.- GH obtenido con Resinase ($S_o'=12,49$ g/l, $E_o'=52,44$ kLU/l, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,95	0,05	8,99	6,45	0,05	8,98
15,70	0,10	17,98	14,42	0,10	17,95
57,42	0,20	35,95	55,27	0,20	35,91
118,20	0,30	53,93	119,40	0,30	53,86
225,32	0,40	71,90	230,37	0,40	71,82

Tabla IIIC.2.- GH obtenido con Resinase ($So'=37,47$ g/l, $Eo'=52,44$ kLU/l, $T=50^{\circ}C$, $pH=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,70	0,20	12,11	3,17	0,20	12,11
12,08	0,40	24,22	13,73	0,40	24,22
29,20	0,60	36,32	32,37	0,60	36,34
61,20	0,80	48,43	67,78	0,80	48,45
99,72	1,00	60,54	103,45	1,00	60,56
157,80	1,20	72,65	150,50	1,20	72,67
232,97	1,30	78,70	239,90	1,30	78,73

Tabla IIIC.3.- GH obtenido con Resinase ($S_o'=63,14$ g/l, $E_o'=52,44$ kLU/l, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 0,20 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,40	2,50	7,27	0,50	0,20	7,26
1,22	4,00	11,63	5,58	0,60	21,79
3,25	5,50	15,99	14,25	1,00	36,32
4,62	7,00	20,35	27,95	1,20	43,59
5,95	8,50	24,71	56,37	1,50	54,48
8,12	10,00	29,07	84,50	1,80	65,38
10,40	11,50	33,43	115,47	2,00	72,64
12,97	13,00	37,79	150,28	2,20	79,91
17,33	14,50	42,15	200,20	2,40	87,17
21,67	16,00	46,51	235,62	2,50	90,80
33,47	17,50	50,87			
45,33	19,00	55,23			
52,52	20,50	59,60			
63,40	22,00	63,96			
91,97	23,50	68,32			
110,95	25,00	72,68			
137,65	26,50	77,04			
163,67	28,00	81,40			
195,68	29,50	85,76			
238,27	31,00	90,12			

Tabla IIIC.4.- GH obtenido con Resinase ($So'=89,33$ g/l, $Eo'=52,44$ kLU/l, $T=50^{\circ}C$, $pH=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,33	0,10	2,60	0,30	0,10	2,60
2,92	0,60	15,57	3,25	0,60	15,57
8,42	1,10	28,55	10,47	1,10	28,55
19,80	1,60	41,53	22,55	1,60	41,52
33,28	2,10	54,51	37,73	2,10	54,50
59,20	2,60	67,48	59,83	2,60	67,47
82,25	3,00	77,87	88,78	3,00	77,85
112,32	3,20	83,06	115,78	3,20	83,04
141,57	3,40	88,25	145,62	3,40	88,23
178,55	3,50	90,84	179,88	3,50	90,83
211,40	3,60	93,44	221,53	3,60	93,42
242,27	3,70	96,04	250,52	3,70	96,02

Tabla III.C.5.- GH obtenido con Resinase ($S_o' = 116,09$ g/l, $E_o' = 52,44$ kLU/l, $T = 50^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,28	0,10	2,02	0,43	0,10	2,02
1,82	0,60	12,11	1,92	0,60	12,11
4,92	1,10	22,20	5,63	1,10	22,21
9,75	1,60	32,30	10,28	1,60	32,30
18,62	2,10	42,39	19,50	2,10	42,40
29,17	2,60	52,48	32,18	2,60	52,49
42,42	3,10	62,57	45,55	3,10	62,58
61,38	3,50	70,65	65,30	3,50	70,66
76,57	3,90	78,72	78,35	3,90	78,73
99,47	4,30	86,80	102,17	4,30	86,81
133,57	4,60	92,85	135,37	4,60	92,87
160,62	4,70	94,87	164,22	4,70	94,88
192,75	4,80	96,89	195,47	4,80	96,90
229,47	4,90	98,91	239,28	4,90	98,92

Tabla IIIC.6.- Residuo no solubilizado para distintas concentraciones de sustrato lipídico (So')

So' (g/l)	Residuo seco inicial (g)	Residuo seco final (g)	Porcentaje de Residuo no solubilizado (%)	Porcentaje de Residuo no solubilizado Media±Desviación estándar (%)
12,49 ¹	5,5554	1,9712	35,48	35,60±0,17
12,49 ²	5,5620	1,9871	35,73	
37,47 ¹	16,4951	4,4561	27,01	27,08±0,10
37,47 ²	16,4892	4,4771	27,15	
63,14 ¹	27,5783	5,7203	20,74	20,54±0,29
63,14 ²	27,4934	5,5881	20,33	
89,33 ¹	38,4733	8,1143	21,09	21,13±0,05
89,33 ²	38,4805	8,1441	21,16	
116,09 ¹	49,4713	9,7210	19,65	19,63±0,03
116,09 ²	49,4648	9,6963	19,60	

¹Experimento 1

²Experimento 2

Tabla III.C.7.- Proteína solubilizada para distintas concentraciones de sustrato lipídico (So')

So' (g/l)	Proteína inicial (g)*	Proteína solubilizada (g)*	Porcentaje de proteína solubilizada (%)	Porcentaje de proteína solubilizada Media±Desviación estándar (%)
12,49 ¹	1,0572	0,3488	32,99	32,97±0,03
12,49 ²	1,0584	0,3487	32,95	
37,47 ¹	3,139	1,1426	36,40	36,28±0,17
37,47 ²	3,1379	1,1346	36,16	
63,14 ¹	5,2481	2,0978	39,97	39,96±0,02
63,14 ²	5,232	2,09	39,95	
89,33 ¹	7,3215	2,9347	40,08	40,11±0,03
89,33 ²	7,3228	2,9386	40,13	
116,09 ¹	9,4144	3,8127	40,50	40,48±0,03
116,09 ²	9,4132	3,8087	40,46	

¹ Experimento 1² Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla III.8.- Colágeno no hidrolizado para distintas concentraciones de sustrato lipídico (So')

So' (g/l)	Colágeno inicial (mg/g)*	Colágeno en fase sólida (mg/g)*	Porcentaje de colágeno no hidrolizado (%)	Porcentaje de colágeno no hidrolizado Media±Desviación estándar (%)
12,49 ¹	67,91	63,32	93,24	93,26±0,03
12,49 ²	67,91	63,35	93,29	
37,47 ¹	67,91	63,33	93,26	93,50±0,34
37,47 ²	67,91	63,66	93,74	
63,14 ¹	67,91	63,52	93,54	93,60±0,09
63,14 ²	67,91	63,61	93,67	
89,33 ¹	67,91	63,86	94,04	94,03±0,01
89,33 ²	67,91	63,85	94,02	
116,09 ¹	67,91	63,88	94,07	93,96±0,16
116,09 ²	67,91	63,73	93,84	

¹Experimento 1

²Experimento 2

*Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla III.9.- Lípidos recuperados para distintas concentraciones de sustrato lipídico (So')

So' (g/l)	Lípidos iniciales (g)	Lípidos separados (g)	Porcentaje de lípidos recuperados (%)	Porcentaje de lípidos recuperados Media±Desviación estándar (%)
12,49 ¹	3,8282	2,9837	77,94	77,68±0,37
12,49 ²	3,8328	2,9672	77,42	
37,47 ¹	11,3668	9,9255	87,32	87,55±0,33
37,47 ²	11,3627	9,9748	87,79	
63,14 ¹	19,0042	18,1750	95,64	95,40±0,33
63,14 ²	18,9457	18,0299	95,17	
89,33 ¹	26,5119	25,4453	95,98	96,01±0,04
89,33 ²	26,5169	25,4657	96,04	
116,09 ¹	34,0907	33,2254	97,46	97,45±0,01
116,09 ²	34,0862	33,2157	97,45	

¹Experimento 1

²Experimento 2

Tabla IIIC.10.- Cantidad de ácidos grasos obtenida para distintas concentraciones de sustrato lipídico (So') (mgácido/glípidos)

Ácido	So' = 12,49 g/l			So' = 37,47 g/l			So' = 63,14 g/l			So' = 89,33 g/l			So' = 116,09 g/l		
	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación
C14:0	15,73	15,75	15,74±0,02	19,38	18,89	19,14±0,35	26,27	27,88	27,08±1,14	31,15	31,24	31,20±0,07	32,52	32,46	32,49±0,04
C14:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C15:0	0,71	0,71	0,71±0,00	0,79	0,79	0,79±0,00	0,95	1,00	0,97±0,04	1,07	1,04	1,05±0,02	1,11	1,06	1,08±0,03
C15:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C16:0	158,21	157,06	157,64±0,81	172,02	167,73	169,88±3,03	198,18	210,26	204,22±8,54	217,60	211,65	224,63±4,20	227,30	217,01	222,16±7,27
C16:1	0,88	0,87	0,88±0,01	1,00	0,96	0,98±0,03	1,07	1,07	1,07±0,00	1,17	1,26	1,21±0,07	1,24	1,20	1,22±0,03
C17:0	14,28	14,18	14,23±0,07	16,15	15,74	15,94±0,30	20,13	21,48	20,80±0,95	22,33	21,92	22,13±0,29	23,73	22,66	23,19±0,76
C17:1	2,40	2,40	2,40±0,01	2,85	2,78	2,81±0,05	3,49	3,31	3,40±0,13	3,74	3,84	3,79±0,07	3,81	3,63	3,72±0,13
C18:0	101,19	102,02	101,60±0,59	109,02	106,31	107,67±1,92	125,99	133,73	129,86±5,47	138,69	138,13	138,41±0,40	144,04	137,52	140,78±4,61
C18:1n9c+t	160,27	159,56	159,91±0,50	177,46	173,03	175,25±3,13	220,06	231,12	225,59±7,82	243,00	236,29	239,64±4,74	230,77	243,06	236,92±8,96
C18:2n6c+t	96,08	97,68	96,88±1,13	105,47	105,59	105,53±0,09	117,48	124,69	121,08±5,10	135,28	131,97	133,62±2,34	139,42	133,11	136,27±4,46
C18:3n3	23,68	23,94	23,81±0,18	26,55	25,89	26,22±0,47	30,02	31,58	30,80±1,10	32,53	33,03	32,78±0,35	33,15	33,55	33,35±0,28
C18:3n6	0,83	0,84	0,83±0,01	1,00	0,96	0,98±0,03	1,12	1,07	1,09±0,04	1,16	1,24	1,20±0,05	1,29	1,28	1,29±0,01
C20:0	0,72	0,73	0,72±0,00	0,82	0,81	0,81±0,01	0,96	1,01	0,99±0,03	1,08	1,10	1,09±0,01	1,09	1,12	1,10±0,02
C20:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C20:2	10,74	10,70	10,72±0,03	11,60	11,31	11,46±0,20	12,72	13,46	13,09±0,53	14,17	13,77	13,97±0,29	14,96	13,74	14,35±0,87
C20:3n3	23,96	24,02	23,99±0,04	25,90	25,83	25,86±0,05	28,66	30,17	29,42±1,07	31,77	30,96	31,37±0,57	32,49	32,67	32,58±0,13
C20:3n6+c21:0	32,14	31,39	31,76±0,53	35,85	34,91	35,38±0,67	42,19	42,29	42,24±0,08	45,33	43,98	44,66±0,95	46,53	44,42	45,47±1,49
C20:4n6	19,39	19,33	19,36±0,04	20,32	19,81	20,07±0,36	23,14	21,78	22,46±0,96	24,10	23,66	23,88±0,31	24,52	24,66	24,59±0,10
TOTAL	661,21	661,18	661,19±0,02	726,19	711,34	718,77±10,50	852,42	895,91	874,16±30,75	944,17	925,10	934,63±13,49	957,98	943,16	950,57±10,48

1* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 1

2* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 2

**D) INFLUENCIA DE LA RELACIÓN
CONCENTRACIÓN DE
RESINASE/CONCENTRACIÓN DE
SUSTRATO LIPÍDICO**

Tabla IIID.1.- GH obtenido con Resinase ($E_o'/S_o' = 0,28$ kLU/g, $T=50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,47	0,20	7,27	0,37	0,10	3,63
6,23	0,40	14,53	5,73	0,30	10,89
18,40	0,60	21,80	16,87	0,50	18,15
38,95	0,80	29,06	33,98	0,70	25,41
59,30	1,00	36,33	63,28	0,90	32,67
105,25	1,20	43,60	99,57	1,10	39,93
169,48	1,40	50,86	160,37	1,30	47,19
247,42	1,50	54,50	235,30	1,50	54,45

Tabla IIID.2.- GH obtenido con Resinase ($Eo'/So' = 0,55$ kLU/g, $T=50^{\circ}C$, $pH=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,51 N)			Experimento 2 (NaOH 2,51 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,45	0,10	3,69	2,00	0,10	3,69
5,75	0,20	7,38	5,33	0,20	7,38
10,92	0,40	14,76	10,42	0,40	14,77
16,03	0,60	22,15	16,62	0,60	22,15
21,45	0,80	29,53	23,78	0,80	29,54
28,90	0,90	33,22	35,62	1,00	36,92
33,78	1,00	36,91	42,12	1,10	40,61
41,37	1,10	40,60	49,33	1,20	44,30
52,28	1,20	44,29	58,13	1,30	48,00
68,47	1,40	51,68	75,60	1,40	51,69
85,67	1,50	55,37	90,28	1,50	55,38
105,22	1,60	59,06	110,33	1,60	59,07
128,25	1,70	62,75	136,28	1,70	62,76
160,30	1,80	66,44	164,60	1,80	66,46
199,18	1,90	70,13	190,33	1,90	70,15
232,48	2,00	73,82	242,13	2,00	73,84

Tabla IIID.3.- GH obtenido con Resinase ($E_o'/S_o' = 0,69$ kLU/g, $T=50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2,70	0,20	12,11	3,17	0,20	12,11
12,08	0,40	24,22	13,73	0,40	24,22
29,20	0,60	36,32	32,37	0,60	36,34
61,20	0,80	48,43	67,78	0,80	48,45
99,72	1,00	60,54	103,45	1,00	60,56
157,80	1,20	72,65	150,50	1,20	72,67
232,97	1,30	78,70	239,90	1,30	78,73

Tabla IIID.4.- GH obtenido con Resinase ($Eo'/So' = 0,83$ kLU/g, $T=50^{\circ}C$, $pH=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 0,20 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,40	2,50	7,27	0,50	0,20	7,26
1,22	4,00	11,63	5,58	0,60	21,79
3,25	5,50	15,99	14,25	1,00	36,32
4,62	7,00	20,35	27,95	1,20	43,59
5,95	8,50	24,71	56,37	1,50	54,48
8,12	10,00	29,07	84,50	1,80	65,38
10,40	11,50	33,43	115,47	2,00	72,64
12,97	13,00	37,79	150,28	2,20	79,91
17,33	14,50	42,15	200,20	2,40	87,17
21,67	16,00	46,51	235,62	2,50	90,80
33,47	17,50	50,87			
45,33	19,00	55,23			
52,52	20,50	59,60			
63,40	22,00	63,96			
91,97	23,50	68,32			
110,95	25,00	72,68			
137,65	26,50	77,04			
163,67	28,00	81,40			
195,68	29,50	85,76			
238,27	31,00	90,12			

Tabla IIID.5.- GH obtenido con Resinase ($Eo'/So' = 1,04$ kLU/g, $T=50^{\circ}C$, $pH=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,33	0,10	2,60	0,30	0,10	2,60
2,92	0,60	15,57	3,25	0,60	15,57
8,42	1,10	28,55	10,47	1,10	28,55
19,80	1,60	41,53	22,55	1,60	41,52
33,28	2,10	54,51	37,73	2,10	54,50
59,20	2,60	67,48	59,83	2,60	67,47
82,25	3,00	77,87	88,78	3,00	77,85
112,32	3,20	83,06	115,78	3,20	83,04
141,57	3,40	88,25	145,62	3,40	88,23
178,55	3,50	90,84	179,88	3,50	90,83
211,40	3,60	93,44	221,53	3,60	93,42
242,27	3,70	96,04	250,52	3,70	96,02

Tabla IIID.6.- GH obtenido con Resinase ($E_o'/S_o' = 1,11 \text{ kLU/g}$, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 0,21 N)			Experimento 2 (NaOH 0,21 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,42	2,20	6,73	0,25	2,00	6,14
1,20	3,80	11,62	1,25	3,80	11,67
3,20	5,40	16,51	3,22	5,60	17,20
4,58	7,00	21,40	5,67	7,40	22,73
5,83	8,60	26,29	10,02	9,20	28,26
7,17	10,20	31,18	17,03	11,00	33,79
10,23	11,80	36,07	23,35	12,80	39,32
12,80	13,40	40,96	34,13	14,60	44,85
17,45	15,00	45,85	45,08	16,40	50,38
22,38	16,60	50,75	55,17	18,20	55,91
33,97	18,20	55,64	67,83	20,00	61,44
45,92	19,80	60,53	79,97	21,80	66,97
53,18	21,40	65,42	95,07	23,60	72,49
65,17	23,00	70,31	108,32	25,40	78,02
79,30	24,60	75,20	135,50	27,20	83,55
93,40	26,20	80,09	156,67	29,00	89,08
107,48	27,80	84,98	179,10	30,80	94,61
133,72	29,40	89,87	198,02	31,20	95,84
155,68	31,00	94,77	216,92	31,50	96,76
178,43	31,50	96,29	235,93	31,80	97,68
199,17	31,90	97,52			
217,18	32,00	97,82			
239,47	32,20	98,43			

Tabla IIID.7.- GH obtenido con Resinase ($E_o'/S_o' = 1,19$ kLU/g, $T=50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,28	0,10	2,02	0,43	0,10	2,02
1,82	0,60	12,11	1,92	0,60	12,11
4,92	1,10	22,20	5,63	1,10	22,21
9,75	1,60	32,30	10,28	1,60	32,30
18,62	2,10	42,39	19,50	2,10	42,40
29,17	2,60	52,48	32,18	2,60	52,49
42,42	3,10	62,57	45,55	3,10	62,58
61,38	3,50	70,65	65,30	3,50	70,66
76,57	3,90	78,72	78,35	3,90	78,73
99,47	4,30	86,80	102,17	4,30	86,81
133,57	4,60	92,85	135,37	4,60	92,87
160,62	4,70	94,87	164,22	4,70	94,88
192,75	4,80	96,89	195,47	4,80	96,90
229,47	4,90	98,91	239,28	4,90	98,92

Tabla III.8.- Residuo no solubilizado para distintas relaciones Resinase/ sustrato (Eo'/So')

Eo'/So' (kLU/g)	Residuo seco inicial (g)	Residuo seco final (g)	Porcentaje de Residuo no solubilizado (%)	Porcentaje de Residuo no solubilizado Media±Desviación estándar (%)
0,28 ¹	27,4868	12,9781	47,22	47,02±0,27
0,28 ²	27,5473	12,9014	46,83	
0,55 ¹	27,5978	8,3249	30,17	29,79±0,53
0,55 ²	27,6039	8,1193	29,41	
0,69 ¹	16,4951	4,4561	27,01	27,08±0,10
0,69 ²	16,4892	4,4771	27,15	
0,83 ¹	27,5783	5,7203	20,74	20,54±0,29
0,83 ²	27,4868	5,5881	20,33	
1,04 ¹	38,4733	7,1143	18,49	18,53±0,05
1,04 ²	38,4805	7,1441	18,57	
1,11 ¹	27,6205	4,2124	15,25	14,76±0,69
1,11 ²	27,4869	3,9221	14,27	
1,19 ¹	49,4713	6,7210	13,59	13,56±0,03
1,19 ²	49,4648	6,6963	13,54	

¹Experimento 1

²Experimento 2

Tabla IIID.9.- Proteína solubilizada para distintas relaciones Resinase/ sustrato (Eo/So)

Eo'/So'	Proteína inicial (g)*	Proteína solubilizada (g)*	Porcentaje de proteína solubilizada (%)	Porcentaje de proteína solubilizada Media±Desviación estándar (%)
0,28 ¹	5,2306	1,8641	35,64	35,55±0,12
0,28 ²	5,2348	1,8568	35,47	
0,55 ¹	5,253	1,9977	38,03	38,00±0,05
0,55 ²	5,2427	1,9902	37,96	
0,69 ¹	3,1390	1,1426	36,40	36,18±0,27
0,69 ²	3,1379	1,1346	36,16	
0,83 ¹	5,2481	2,0978	39,97	39,96±0,02
0,83 ²	5,232	2,0900	39,95	
1,04 ¹	7,3215	2,9347	40,08	40,11±0,03
1,04 ²	7,3228	2,9386	40,13	
1,11 ¹	5,2562	2,2171	42,18	42,24±0,09
1,11 ²	5,2308	2,2131	42,31	
1,19 ¹	9,4144	3,8127	40,50	40,48±0,03
1,19 ²	9,4132	3,8087	40,46	

¹Experimento 1²Experimento 2

*Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIID.10.- Colágeno no hidrolizado para distintas relaciones Resinase/ sustrato (Eo/So)

Eo'/So'	Colágeno inicial (mg/g)*	Colágeno en fase sólida (mg/g)*	Porcentaje de colágeno no hidrolizado (%)	Porcentaje de colágeno no hidrolizado Media±Desviación estándar (%)
0,28 ¹	67,91	63,29	93,20	93,41±0,30
0,28 ²	67,91	63,58	93,62	
0,55 ¹	67,91	63,31	93,23	93,26±0,05
0,55 ²	67,91	63,36	93,30	
0,69 ¹	67,91	63,33	93,26	93,50±0,34
0,69 ²	67,91	63,66	93,74	
0,83 ¹	67,91	63,52	93,54	93,60±0,09
0,83 ²	67,91	63,61	93,67	
1,04 ¹	67,91	63,86	94,04	94,03±0,01
1,04 ²	67,91	63,85	94,02	
1,11 ¹	67,91	63,88	94,07	94,05±0,02
1,11 ²	67,91	63,86	94,04	
1,19 ¹	67,91	63,88	94,07	93,96±0,16
1,19 ²	67,91	63,73	93,84	

¹Experimento 1

²Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIID.11.- Lípidos recuperados para distintas relaciones Resinase/ sustrato (Eo'/So')

Eo'/So' (kLU/g)	Lípidos iniciales (g)	Lípidos separados (g)	Porcentaje de lípidos recuperados (%)	Porcentaje de lípidos recuperados Media±Desviación estándar (%)
0,28 ¹	18,9407	12,2123	64,48	65,00±0,75
0,28 ²	18,9560	12,4221	65,53	
0,55 ¹	19,0218	15,1009	79,39	79,05±0,48
0,55 ²	18,9846	14,9420	78,71	
0,69 ¹	11,3668	9,9255	87,32	87,55±0,33
0,69 ²	11,3627	9,9748	87,79	
0,83 ¹	19,0042	18,1750	95,64	95,40±0,33
0,83 ²	18,9457	18,0299	95,17	
1,04 ¹	26,5119	25,4453	95,98	96,01±0,04
1,04 ²	26,5169	25,4657	96,04	
1,11 ¹	19,0333	18,3722	96,53	97,07±0,76
1,11 ²	18,9412	18,4881	97,61	
1,19 ¹	34,0907	33,2254	97,46	97,45±0,01
1,19 ²	34,0862	33,2157	97,45	

¹Experimento 1

²Experimento 2

Tabla IIID.12.- Cantidad de ácidos grasos obtenida para distintas relaciones de Resinase/sustrato lipídico (Eo'/So') (mgácido/glípidos)

Ácido	Eo'/So' = 0,28 kLU/g			Eo'/So' = 0,55 kLU/g			Eo'/So' = 0,69 kLU/g			Eo'/So' = 0,83 kLU/g		
	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación
C14:0	18,84	18,71	18,78±0,09	21,69	23,24	22,46±1,09	21,51	20,97	21,24±0,38	26,27	27,88	27,08±1,14
C14:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C15:0	0,78	0,79	0,79±0,01	0,84	0,84	0,84±0,00	0,88	0,88	0,88±0,00	0,95	1,00	0,97±0,04
C15:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C16:0	146,20	146,66	146,43±0,338	163,84	164,98	164,41±0,81	190,94	186,18	188,56±3,36	198,18	210,26	204,22±8,54
C16:1	0,78	0,77	0,77±0,01	0,88	0,89	0,89±0,01	1,10	1,06	1,08±0,03	1,07	1,07	1,07±0,00
C17:0	15,50	15,43	15,46±0,05	16,86	16,89	16,87±0,02	17,93	17,47	17,70±0,33	20,13	21,48	20,80±0,95
C17:1	2,77	2,68	2,72±0,06	2,98	2,99	2,99±0,01	3,16	3,08	3,12±0,06	3,49	3,31	3,40±0,13
C18:0	94,74	97,05	95,90±1,64	104,94	105,67	105,30±0,52	121,02	118,00	119,51±2,13	125,99	133,73	129,86±5,47
C18:1n9c+t	160,93	159,94	160,44±0,70	171,49	172,70	172,10±0,86	196,99	192,07	194,53±3,48	220,06	231,12	225,59±7,82
C18:2n6c+t	89,52	87,57	88,54±1,38	99,03	98,79	98,91±0,17	117,07	117,20	117,14±0,10	117,48	124,69	121,08±5,10
C18:3n3	27,81	27,98	27,90±0,12	29,15	29,29	29,22±0,09	29,48	28,74	29,11±0,52	30,02	31,58	30,80±1,10
C18:3n6	0,37	0,37	0,37±0,00	0,56	0,61	0,59±0,03	1,11	1,07	1,01±0,03	1,12	1,07	1,09±0,04
C20:0	0,67	0,68	0,68±0,01	0,80	0,78	0,79±0,01	0,91	0,90	0,90±0,01	0,96	1,01	0,99±0,03
C20:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C20:2	9,37	9,34	9,36±0,02	10,70	10,35	10,53±0,25	12,88	12,56	12,72±0,23	12,72	13,46	13,09±0,53
C20:3n3	21,26	20,93	21,10±0,23	24,43	23,05	23,74±0,98	28,74	28,67	28,71±0,05	28,66	30,17	29,42±1,07
C20:3n6+c21:0	34,93	34,69	34,81±0,17	38,07	38,30	38,19±0,16	39,80	38,75	39,28±0,74	42,19	42,29	42,24±0,08
C20:4n6	15,48	15,91	15,69±0,30	17,36	17,05	17,20±0,22	22,56	21,99	22,27±0,40	23,14	21,78	22,46±0,96
TOTAL	639,96	639,51	639,74±0,32	703,62	706,42	705,02±1,98	806,07	789,59	797,83±11,66	852,42	895,91	874,16±30,75

1* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 1

2* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 2

Tabla IIID.12.- Cantidad de ácidos grasos obtenida para distintas relaciones de Resinase/sustrato lipídico (Eo'/So') (mg_{ácido}/g_{lípidos})

(continuación)

Ácido	Eo'/So' = 1,04 kLU/g			Eo'/So' = 1,11 kLU/g			Eo'/So' = 1,19 kLU/g		
	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación
C14:0	31,15	31,24	31,20±0,07	28,39	29,74	29,06±0,95	32,52	32,46	32,49±0,04
C14:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C15:0	1,07	1,04	1,05±0,02	1,06	1,08	1,07±0,01	1,11	1,06	1,08±0,03
C15:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C16:0	217,60	211,65	224,63±4,20	219,34	218,40	218,87±0,67	227,30	217,01	222,16±7,27
C16:1	1,17	1,26	1,21±0,07	1,13	1,17	1,15±0,03	1,24	1,20	1,22±0,03
C17:0	22,33	21,92	22,13±0,29	22,75	22,36	22,56±0,28	23,73	22,66	23,19±0,76
C17:1	3,74	3,84	3,79±0,07	3,57	3,62	3,60±0,03	3,81	3,63	3,72±0,13
C18:0	138,69	138,13	138,41±0,40	142,78	143,97	143,38±0,84	144,04	137,52	140,78±4,61
C18:1n9c+t	243,00	236,29	239,64±4,74	258,25	256,35	257,30±1,34	230,77	243,06	236,92±8,96
C18:2n6c+t	135,28	131,97	133,62±2,34	123,53	127,70	125,62±2,95	139,42	133,11	136,27±4,46
C18:3n3	32,53	33,03	32,78±0,35	31,37	32,32	31,84±0,67	33,15	33,55	33,35±0,28
C18:3n6	1,16	1,24	1,20±0,05	1,21	1,20	1,20±0,01	1,29	1,28	1,29±0,01
C20:0	1,08	1,10	1,09±0,01	1,03	1,09	1,06±0,04	1,09	1,12	1,10±0,02
C20:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C20:2	14,17	13,77	13,97±0,29	14,30	13,98	14,14±0,23	14,96	13,74	14,35±0,87
C20:3n3	31,77	30,96	31,37±0,57	32,49	32,31	32,40±0,13	32,49	32,67	32,58±0,13
C20:3n6+c21:0	45,33	43,98	44,66±0,95	42,97	44,18	43,58±0,86	46,53	44,42	45,47±1,49
C20:4n6	24,10	23,66	23,88±0,31	24,22	23,87	24,05±0,25	24,52	24,66	24,59±0,10
TOTAL	944,17	925,10	934,63±13,49	948,42	953,34	950,88±3,48	957,98	943,16	950,57±10,48

1* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 1

2* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 2

E) INFLUENCIA DEL pH

Tabla IIIE.1.- GH obtenido con Resinase ($S_o'=63,14$ g/l, $E_o'=52,44$ kLU/l, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,47	0,10	3,63	0,48	0,10	3,63
2,47	0,40	14,53	4,25	0,40	14,51
9,42	0,70	25,43	11,58	0,70	25,38
28,20	1,00	36,33	29,53	1,00	36,26
59,70	1,30	47,23	63,45	1,30	47,14
114,82	1,60	58,13	104,92	1,60	58,02
162,52	1,80	65,39	165,77	1,80	65,28
230,85	1,90	69,02	239,45	1,90	68,90

Tabla IIIE.2.- GH obtenido con Resinase ($S_o'=63,14$ g/l, $E_o'=52,44$ kLU/l, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7,5$)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,55	0,20	7,27	0,48	0,20	7,23
4,47	0,50	18,17	6,17	0,50	18,07
12,55	0,80	29,07	9,88	0,80	28,91
25,97	1,10	39,97	21,30	1,10	39,75
55,88	1,40	50,87	54,88	1,40	50,59
91,20	1,60	58,13	94,87	1,60	57,82
119,35	1,80	65,40	128,18	1,80	65,04
160,45	2,00	72,66	166,30	2,00	72,27
239,27	2,20	79,93	229,85	2,20	79,50

Tabla IIIE.3.- GH obtenido con Resinase ($So' = 63,14$ g/l, $Eo' = 52,44$ kLU/l, $T = 50$ °C, $pH = 8,0$)

Experimento 1 (NaOH 0,20 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	V _{NaOH} (ml)	t (min)	V _{NaOH} (ml)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,40	2,50	7,27	0,50	0,20	7,26
1,22	4,00	11,63	5,58	0,60	21,79
3,25	5,50	15,99	14,25	1,00	36,32
4,62	7,00	20,35	27,95	1,20	43,59
5,95	8,50	24,71	56,37	1,50	54,48
8,12	10,00	29,07	84,50	1,80	65,38
10,40	11,50	33,43	115,47	2,00	72,64
12,97	13,00	37,79	150,28	2,20	79,91
17,33	14,50	42,15	200,20	2,40	87,17
21,67	16,00	46,51	235,62	2,50	90,80
33,47	17,50	50,87			
45,33	19,00	55,23			
52,52	20,50	59,60			
63,40	22,00	63,96			
91,97	23,50	68,32			
110,95	25,00	72,68			
137,65	26,50	77,04			
163,67	28,00	81,40			
195,68	29,50	85,76			
238,27	31,00	90,12			

Tabla IIIE.4.- GH obtenido con Resinase (So'=63,14 g/l, Eo'=52,44 kLU/l, T=50°C, pH=8,5)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,43	0,20	7,27	0,42	0,20	7,25
5,42	0,50	18,16	4,25	0,50	18,12
13,98	0,80	29,06	12,42	0,80	29,00
25,37	1,10	39,96	22,30	1,10	39,87
35,20	1,40	50,86	39,35	1,40	50,74
56,62	1,70	61,75	57,38	1,70	61,62
82,80	2,00	72,65	79,37	2,00	72,49
99,27	2,20	79,92	96,73	2,20	79,74
122,32	2,30	83,55	119,30	2,30	83,37
152,40	2,40	87,18	148,23	2,40	86,99
179,33	2,50	90,82	175,45	2,50	90,61
232,87	2,60	94,45	224,20	2,60	94,24

Tabla IIIE.5.- GH obtenido con Resinase ($S_o'=63,14$ g/l, $E_o'=52,44$ kLU/l, $T=50^\circ\text{C}$, $\text{pH}=9,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,28	0,20	7,26	0,32	0,20	7,27
0,52	0,50	18,16	0,62	0,50	18,17
3,30	0,80	29,05	3,97	0,80	29,07
7,32	1,10	39,95	8,80	1,10	39,97
15,02	1,40	50,84	17,37	1,40	50,87
25,20	1,70	61,73	29,90	1,70	61,77
39,85	2,00	72,63	43,45	2,00	72,68
55,80	2,10	76,26	59,30	2,10	76,31
72,20	2,20	79,89	78,52	2,20	79,94
92,17	2,30	83,52	97,32	2,30	83,58
116,23	2,40	87,15	119,73	2,40	87,21
139,63	2,50	90,79	144,87	2,50	90,84
168,20	2,60	94,42	177,38	2,60	94,48
216,28	2,70	98,05	226,48	2,70	98,11

Tabla IIIE.6.- Residuo no solubilizado para distintos pH

pH	Residuo seco inicial (g)	Residuo seco final (g)	Porcentaje de Residuo no solubilizado (%)	Porcentaje de Residuo no solubilizado Media±Desviación estándar (%)
7,0 ¹	27,4879	7,1371	25,96	25,87±0,13
7,0 ²	27,5368	7,1000	25,78	
7,5 ¹	27,4851	6,7812	24,67	24,60±0,10
7,5 ²	27,6348	6,7791	24,53	
8,0 ¹	27,5783	5,7203	20,74	20,54±0,29
8,0 ²	27,4934	5,5881	20,33	
8,5 ¹	27,4897	4,1211	14,99	14,92±0,10
8,5 ²	27,5508	4,0923	14,85	
9,0 ¹	27,4987	3,0997	11,27	11,32±0,06
9,0 ²	27,4810	3,1221	11,36	

¹Experimento 1

²Experimento 2

Tabla IIIE.7.- Proteína solubilizada para distintos pH

pH	Proteína inicial (g)*	Proteína solubilizada (g)*	Porcentaje de proteína solubilizada (%)	Porcentaje de proteína solubilizada Media±Desviación estándar (%)
7,0 ¹	5,231	1,9827	37,90	37,87±0,05
7,0 ²	5,2403	1,9827	37,84	
7,5 ¹	5,2304	2,0304	38,82	38,79±0,04
7,5 ²	5,2589	2,0384	38,76	
8,0 ¹	5,2481	2,0978	39,97	39,96±0,02
8,0 ²	5,232	2,09	39,95	
8,5 ¹	5,2313	2,2414	42,85	42,76±0,12
8,5 ²	5,2429	2,2374	42,67	
9,0 ¹	5,233	2,2932	43,82	43,80±0,03
9,0 ²	5,2296	2,2892	43,77	

¹Experimento 1²Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIIE.8.- Colágeno no hidrolizado para distintos pH

pH	Colágeno inicial (mg/g)*	Colágeno en fase sólida (mg/g)*	Porcentaje de colágeno no hidrolizado (%)	Porcentaje de colágeno no hidrolizado Media±Desviación estándar (%)
7,0 ¹	67,91	63,69	93,78	93,70±0,12
7,0 ²	67,91	63,58	93,62	
7,5 ¹	67,91	63,28	93,19	93,17±0,02
7,5 ²	67,91	63,26	93,16	
8,0 ¹	19,0042	18,1750	95,64	93,60±0,09
8,0 ²	18,9457	18,0299	95,17	
8,5 ¹	67,91	63,36	93,30	93,27±0,04
8,5 ²	67,91	63,32	93,24	
9,0 ¹	67,91	63,33	93,25	93,26±0,01
9,0 ²	67,91	63,34	93,27	

¹Experimento 1

²Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IIIE.9.- Lípidos recuperados para distintos pH

pH	Lípidos iniciales (g)	Lípidos separados (g)	Porcentaje de lípidos recuperados (%)	Porcentaje de lípidos recuperados Media±Desviación estándar (%)
7,0 ¹	18,9419	14,6544	77,36	77,36±0,01
7,0 ²	18,9757	14,6791	77,36	
7,5 ¹	18,9400	17,3112	91,40	91,31±0,12
7,5 ²	19,0432	17,3724	91,23	
8,0 ¹	19,0042	18,1750	95,64	95,40±0,33
8,0 ²	18,9457	18,0299	95,17	
8,5 ¹	18,9432	18,2814	96,51	96,45±0,08
8,5 ²	18,9852	18,3017	96,40	
9,0 ¹	18,9494	18,5079	97,67	97,68±0,02
9,0 ²	18,9372	18,5011	97,70	

¹Experimento 1²Experimento 2

Tabla III.E.10.- Cantidad de ácidos grasos obtenida para distintos pH (mgácido/glípidos)

Ácido	pH = 7,0			pH = 7,5			pH = 8,0			pH = 8,5			pH = 9,0		
	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación
C14:0	20,09	20,26	20,17±0,12	22,78	23,49	23,14±0,50	26,27	27,88	27,08±1,14	29,12	27,34	28,23±1,26	29,83	29,80	29,82±0,02
C14:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C15:0	0,76	0,76	0,76±0,00	0,92	0,91	0,91±0,01	0,95	1,00	0,97±0,04	0,95	0,99	0,99±0,03	1,00	1,04	1,02±0,03
C15:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C16:0	171,04	170,97	171,00±0,05	185,90	186,31	186,10±0,29	198,18	210,26	204,22±8,54	210,18	215,21	212,69±3,56	216,20	214,75	215,47±1,03
C16:1	1,03	1,01	1,02±0,01	1,04	1,11	1,08±0,05	1,07	1,07	1,07±0,00	1,10	1,07	1,09±0,02	1,15	1,15	1,15±0,00
C17:0	17,14	17,43	17,29±0,20	18,52	19,41	18,97±0,63	20,13	21,48	20,80±0,95	21,91	22,09	22,00±0,13	22,60	22,46	22,53±0,10
C17:1	2,94	2,85	2,89±0,06	2,98	3,11	3,05±0,13	3,49	3,31	3,40±0,13	3,74	3,74	3,74±0,01	3,82	3,87	3,84±0,03
C18:0	103,49	99,96	101,72±2,49	115,42	117,85	116,64±1,72	125,99	133,73	129,86±5,47	135,76	135,63	135,69±0,09	140,75	140,22	140,49±0,38
C18:1n9c+t	182,15	185,28	183,71±2,21	198,20	192,57	195,39±3,98	220,06	231,12	225,59±7,82	231,56	231,80	231,68±0,17	235,07	233,45	234,26±1,15
C18:2n6c+t	85,50	86,81	86,15±0,92	102,38	101,14	101,76±0,88	117,48	124,69	121,08±5,10	126,54	126,78	126,66±0,17	130,82	131,67	131,24±0,60
C18:3n3	28,90	28,68	28,79±0,15	30,19	30,37	30,28±0,13	30,02	31,58	30,80±1,10	32,48	32,40	32,40±0,05	33,16	32,92	33,04±0,17
C18:3n6	1,05	1,09	1,07±0,03	1,13	1,17	1,15±0,03	1,12	1,07	1,09±0,04	1,17	1,26	1,21±0,06	1,14	1,20	1,17±0,04
C20:0	0,85	0,84	0,85±0,01	0,96	0,89	0,92±0,05	0,96	1,01	0,99±0,03	1,06	1,07	1,07±0,01	1,14	1,13	1,13±0,01
C20:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C20:2	10,60	10,54	10,57±0,04	11,69	11,28	11,48±0,29	12,72	13,46	13,09±0,53	13,43	13,47	13,45±0,03	13,76	13,64	13,70±0,08
C20:3n3	24,02	24,07	24,05±0,03	24,99	25,97	25,48±0,69	28,66	30,17	29,42±1,07	30,62	30,66	30,64±0,03	31,36	31,53	31,44±0,12
C20:3n6+c21:0	37,37	37,54	37,45±0,11	39,81	39,95	39,88±0,10	42,19	42,29	42,24±0,08	43,08	43,02	43,05±0,04	43,83	43,65	43,74±0,13
C20:4n6	17,84	17,26	17,55±0,41	19,60	19,68	19,64±0,06	23,14	21,78	22,46±0,96	23,14	23,04	23,09±0,07	23,65	23,51	23,58±0,10
TOTAL	704,77	705,33	705,05±0,39	776,51	775,22	775,87±0,91	852,42	895,91	874,16±30,75	905,85	909,57	907,71±2,63	929,28	925,98	927,63±2,33

1* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 1

2* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 2

F) INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Tabla IIIF.1.- GH obtenido con Resinase ($S_o'=63,14$ g/l, $E_o'=52,44$ kLU/l, $T=40$ °C, $pH=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,37	0,20	7,27	0,30	0,20	7,24
0,92	0,60	21,80	0,70	0,60	21,73
5,20	1,00	36,33	4,37	1,00	36,22
13,73	1,20	43,60	10,47	1,20	43,46
20,25	1,50	54,49	18,48	1,50	54,33
52,23	1,80	65,39	48,57	1,80	65,19
80,75	2,00	72,66	76,68	2,00	72,44
99,48	2,20	79,92	94,60	2,20	79,68
125,25	2,40	87,19	119,97	2,40	86,93
157,25	2,50	90,82	151,30	2,50	90,55
195,52	2,60	94,46	190,18	2,60	94,17
239,85	2,70	98,09	235,37	2,70	97,79

Tabla III F.2.- GH obtenido con Resinase ($S_o'=63,14$ g/l, $E_o'=52,44$ kLU/l, $T=45$ °C, $pH=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,47	0,20	7,23	0,33	0,20	7,27
1,20	0,60	21,70	1,27	0,60	21,80
6,17	1,00	36,17	7,35	1,00	36,33
16,52	1,20	43,40	18,67	1,20	43,60
25,28	1,50	54,26	29,62	1,50	54,50
59,73	1,80	65,11	68,18	1,80	65,40
89,18	2,00	72,34	95,48	2,00	72,67
119,37	2,20	79,58	122,52	2,20	79,94
159,37	2,40	86,81	162,25	2,40	87,20
199,68	2,50	90,43	202,27	2,50	90,84
239,52	2,60	94,04	243,28	2,60	94,47

Tabla IIIF.3.- GH obtenido con Resinase ($S_o'=63,14$ g/l, $E_o'=52,44$ kLU/l, $T=50$ °C, $pH=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 0,20 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	t (min)	V _{NaOH} (ml)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,40	2,50	7,27	0,50	0,20	7,26
1,22	4,00	11,63	5,58	0,60	21,79
3,25	5,50	15,99	14,25	1,00	36,32
4,62	7,00	20,35	27,95	1,20	43,59
5,95	8,50	24,71	56,37	1,50	54,48
8,12	10,00	29,07	84,50	1,80	65,38
10,40	11,50	33,43	115,47	2,00	72,64
12,97	13,00	37,79	150,28	2,20	79,91
17,33	14,50	42,15	200,20	2,40	87,17
21,67	16,00	46,51	235,62	2,50	90,80
33,47	17,50	50,87			
45,33	19,00	55,23			
52,52	20,50	59,60			
63,40	22,00	63,96			
91,97	23,50	68,32			
110,95	25,00	72,68			
137,65	26,50	77,04			
163,67	28,00	81,40			
195,68	29,50	85,76			
238,27	31,00	90,12			

Tabla III F.4.- GH obtenido con Resinase ($So' = 63,14$ g/l, $Eo' = 52,44$ kLU/l, $T = 55$ °C, $pH = 8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,68	0,20	7,23	0,63	0,20	7,24
8,25	0,60	21,70	7,75	0,60	21,72
19,37	1,00	36,17	17,68	1,00	36,20
35,47	1,20	43,41	33,85	1,20	43,44
69,38	1,50	54,26	65,75	1,50	54,30
104,50	1,80	65,11	100,30	1,80	65,16
135,52	2,00	72,35	130,80	2,00	72,40
170,28	2,20	79,58	165,43	2,20	79,64
219,43	2,40	86,82	213,42	2,40	86,88

Tabla III F.5.- GH obtenido con Resinase ($S_o'=63,14$ g/l, $E_o'=52,44$ kLU/l, $T=60$ °C, $pH=8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)			Experimento 2 (NaOH 2,46 N)		
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,55	0,20	7,27	1,47	0,20	7,26
12,48	0,60	21,80	10,32	0,60	21,79
27,68	1,00	36,33	25,45	1,00	36,31
48,28	1,20	43,60	45,78	1,20	43,57
82,17	1,50	54,50	80,83	1,50	54,47
155,22	1,80	65,40	149,55	1,80	65,36
224,38	2,00	72,67	220,32	2,00	72,62

Tabla III.F.6.- Residuo no solubilizado para distintas temperaturas

T (°C)	Residuo seco inicial (g)	Residuo seco final (g)	Porcentaje de Residuo no solubilizado (%)	Porcentaje de Residuo no solubilizado Media±Desviación estándar (%)
40 ¹	27,4873	2,9605	10,77	10,82±0,07
40 ²	27,5710	2,9956	10,87	
45 ¹	28,6081	3,9907	13,95	14,23±0,40
45 ²	27,4836	3,9898	14,52	
50 ¹	27,5783	5,7203	20,74	20,54±0,29
50 ²	27,4934	5,5881	20,33	
55 ¹	27,6051	6,3796	23,11	23,07±0,05
55 ²	27,5856	6,3545	23,04	
60 ¹	27,4848	7,0630	25,70	25,72±0,03
60 ²	27,5013	7,0788	25,74	

¹Experimento 1

²Experimento 2

Tabla III F.7.- Proteína solubilizada para distintas temperaturas

T (°C)	Proteína inicial (g)*	Proteína solubilizada (g)*	Porcentaje de proteína solubilizada (%)	Porcentaje de proteína solubilizada Media±Desviación estándar (%)
40 ¹	5,2308	2,1897	41,86	41,76±0,14
40 ²	5,2468	2,1858	41,66	
45 ¹	5,2538	2,1379	40,69	40,67±0,03
45 ²	5,2301	2,126	40,65	
50 ¹	5,2481	2,0978	39,97	39,92±0,07
50 ²	5,232	2,0862	39,87	
55 ¹	5,2532	1,9946	37,97	37,98±0,02
55 ²	5,2495	1,9946	38,00	
60 ¹	5,2304	1,911	36,54	36,53±0,02
60 ²	5,2335	1,911	36,51	

¹Experimento 1²Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla III.F.8.- Colágeno no hidrolizado para distintas temperaturas

T (°C)	Colágeno inicial (mg/g)*	Colágeno en fase sólida (mg/g)*	Porcentaje de colágeno no hidrolizado (%)	Porcentaje de colágeno no hidrolizado Media±Desviación estándar (%)
40 ¹	67,91	63,3408	93,27	93,28±0,01
40 ²	67,91	63,3473	93,28	
45 ¹	67,91	63,273	93,17	93,15±0,03
45 ²	67,91	63,2433	93,13	
50 ¹	67,91	63,5179	93,53	93,44±0,13
50 ²	67,91	63,3944	93,35	
55 ¹	67,91	63,0885	92,90	92,91±0,02
55 ²	67,91	63,1056	92,93	
60 ¹	67,91	63,2547	93,14	93,16±0,02
60 ²	67,91	63,2724	93,17	

¹Experimento 1

²Experimento 2

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla III.F.9.- Lípidos recuperados para distintas temperaturas

T (°C)	Lípidos iniciales (g)	Lípidos separados (g)	Porcentaje de lípidos recuperados (%)	Porcentaje de lípidos recuperados Media±Desviación estándar (%)
40 ¹	18,9415	18,7239	98,85	98,89±0,05
40 ²	18,9991	18,7955	98,93	
45 ¹	19,0247	18,5005	97,24	97,29±0,06
45 ²	18,939	18,4331	97,33	
50 ¹	19,0042	18,1750	95,64	95,39±0,34
50 ²	18,9487	18,0299	95,15	
55 ¹	19,0227	16,5501	87,00	87,01±0,01
55 ²	19,0093	16,5411	87,02	
60 ¹	18,9398	12,8881	68,05	68,12±0,10
60 ²	18,9511	12,9231	68,19	

¹Experimento 1²Experimento 2

Tabla III.F.10.- Cantidad de ácidos grasos obtenida para distintas temperaturas (mgácido/glípidos)

Ácido	40°C			45°C			50°C			55°C			60°C		
	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación	1*	2*	Media± Desviación
C14:0	28,57	27,96	28,26±0,43	26,65	28,08	27,36±1,01	26,27	27,88	27,08±1,14	26,41	26,99	26,70±0,41	24,05	25,06	24,55±0,72
C14:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C15:0	1,08	1,13	1,10±0,03	1,08	1,03	1,05±0,03	0,95	1,00	0,97±0,04	0,93	0,87	0,90±0,04	0,64	0,65	0,65±0,01
C15:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C16:0	229,81	231,52	230,67±1,21	219,52	213,75	216,64±4,08	198,18	210,26	204,22±8,54	192,76	186,46	189,61±4,45	149,86	149,08	149,47±0,55
C16:1	1,18	1,21	1,19±0,01	1,11	1,16	1,13±0,03	1,07	1,07	1,07±0,00	1,00	1,07	1,03±0,05	0,84	0,82	0,83±0,01
C17:0	23,20	23,08	23,14±0,09	22,49	21,65	22,07±0,59	20,13	21,48	20,80±0,95	19,66	20,40	20,03±0,52	15,27	15,36	15,32±0,07
C17:1	4,18	4,19	4,19±0,01	3,93	3,58	3,75±0,24	3,49	3,31	3,40±0,13	3,01	2,90	2,96±0,08	2,03	1,98	2,01±0,04
C18:0	142,37	143,64	143,01±0,90	136,49	135,07	135,78±1,00	125,99	133,73	129,86±5,47	125,03	125,80	125,41±0,55	96,89	97,73	97,31±0,59
C18:1n9c+t	235,36	231,61	233,49±2,65	230,28	230,09	230,18±0,13	220,06	231,12	225,59±7,82	212,01	218,49	215,25±4,58	195,39	189,38	192,38±4,25
C18:2n6c+t	136,77	134,37	135,57±1,70	127,34	127,53	127,44±0,13	117,48	124,69	121,08±5,10	113,23	115,77	114,50±1,80	85,27	85,32	85,30±0,03
C18:3n3	40,54	40,47	40,50±0,05	36,75	35,02	35,89±1,23	30,02	31,58	30,80±1,10	27,67	26,61	27,14±0,75	12,21	11,23	11,72±0,69
C18:3n6	1,20	1,17	1,19±0,02	1,15	1,17	1,16±0,01	1,12	1,07	1,09±0,04	1,07	1,15	1,11±0,06	0,92	0,95	0,94±0,02
C20:0	1,14	1,12	1,13±0,01	1,04	1,00	1,02±0,03	0,96	1,01	0,99±0,03	0,91	0,89	0,90±0,01	0,70	0,70	0,70±0,00
C20:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C20:2	14,07	14,16	14,11±0,06	13,45	13,77	13,61±0,22	12,72	13,46	13,09±0,53	12,67	12,67	12,67±0,01	9,97	10,28	10,13±0,22
C20:3n3	33,21	32,99	33,10±0,16	31,87	31,50	31,69±0,26	28,66	30,17	29,42±1,07	27,99	28,10	28,04±0,07	21,35	21,54	21,45±0,13
C20:3n6+c21:0	43,99	43,77	43,88±0,16	43,79	42,94	43,36±0,60	42,19	42,29	42,24±0,08	38,59	40,27	39,43±1,19	31,58	31,84	31,71±0,18
C20:4n6	24,65	25,31	24,98±0,47	23,49	23,51	23,50±0,01	23,14	21,78	22,46±0,96	20,77	20,47	20,62±0,21	13,40	13,51	13,46±0,07
TOTAL	961,33	957,69	959,51±2,57	920,47	910,80	915,64±6,84	852,42	895,91	874,16±30,75	823,68	828,91	826,30±3,70	660,37	655,43	657,90±3,49

1* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 1

2* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento 2

**G) ADICIÓN EXTRA DE SUSTRATO
LIPÍDICO**

Tabla III G.1.- GH obtenido con Resinase ($So' = 63,14$ g/l, $Eo' = 52,44$ kLU/l, $T = 50^{\circ}C$, $pH = 8,0$)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)						Experimento 2 (NaOH 2,46 N)					
t (min)	V_{NaOH} (ml)	GH (%)	t^* (min)	V_{NaOH}^* (ml)	GH* (%)	t (min)	V_{NaOH} (ml)	GH (%)	t^* (min)	V_{NaOH}^* (ml)	GH* (%)
0,00	0,00	0,00	60,50	1,60	58,11	0,00	0,00	0,00	60,61	1,60	57,85
0,50	0,10	3,63	100,43	1,90	69,01	2,05	0,40	14,46	81,15	1,80	65,08
4,46	0,50	18,16	136,66	2,10	76,28	10,00	0,90	32,54	111,86	2,00	72,31
12,35	0,90	32,69	180,01	2,30	83,54	19,53	1,10	39,77	143,51	2,20	79,54
26,15	1,20	43,59	230,22	2,50	90,80	35,01	1,30	47,00	192,12	2,40	86,77
39,00	1,40	50,85				50,83	1,50	54,23	236,52	2,50	90,39

* Adición extra de 15,78 g/l de sustrato lipídico al reactor

H) ADICIÓN EXTRA DE RESINASE

Tabla IIIH.1.- GH obtenido con Resinase (So´=63,14 g/l, Eo´=52,44 kLU/l, T=50 °C, pH=8,0)

Experimento 1 (NaOH 2,46 N)						Experimento 2 (NaOH 2,46 N)					
t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t* (min)	V _{NaOH} * (ml)	GH* (%)	t (min)	V _{NaOH} (ml)	GH (%)	t* (min)	V _{NaOH} * (ml)	GH* (%)
0,00	0,00	0,00	60,00	1,60	57,30	0,00	0,00	0,00	60,00	1,60	57,39
0,63	0,20	7,16	60,12	1,70	60,88	0,47	0,20	7,17	60,17	1,70	60,98
1,72	0,40	14,33	60,37	1,80	64,46	1,22	0,40	14,35	60,55	1,80	64,56
3,58	0,50	17,91	61,83	1,90	68,05	3,08	0,50	17,93	61,80	1,90	68,15
4,95	0,60	21,49	63,47	2,00	71,63	4,48	0,60	21,52	63,97	2,00	71,74
6,98	0,70	25,07	66,98	2,10	75,21	6,73	0,70	25,11	67,45	2,10	75,32
8,95	0,80	28,65	71,13	2,20	78,79	8,62	0,80	28,70	72,73	2,20	78,91
11,73	0,90	32,23	78,75	2,30	82,37	12,37	0,90	32,28	79,95	2,30	82,50
14,97	1,00	35,81	90,37	2,40	85,95	14,30	1,00	35,87	92,20	2,40	86,09
19,33	1,10	39,40	105,38	2,50	89,53	19,18	1,10	39,46	108,48	2,50	89,67
23,67	1,20	42,98	119,97	2,60	93,12	24,75	1,20	43,04	119,75	2,60	93,26
33,47	1,30	46,56	143,17	2,70	96,70	32,30	1,30	46,63	140,30	2,70	96,85
45,33	1,40	50,14	169,32	2,80	100,00	45,43	1,40	50,22	167,67	2,80	100,00
58,75	1,50	53,72				57,08	1,50	53,80			

* Adición extra de 52,44 kLU/l de Resinase al reactor

**ANEXO IV: HIDRÓLISIS CON
PROTEASA+LIPASA**

Tabla IV.1.- Consumo de base en experimento 1 con Alcalasa+Resinase (Eo/So=0,11
UA/g, Eo'/So'=0,55 kLU/g, T=45°C, pH=7,5) *

Experimento A (NaOH 2,46 N)		Experimento B (NaOH 2,46 N)	
t (min)	V _{NaOH} (ml)	t (min)	V _{NaOH} (ml)
0,00	0,00	0,00	0,00
0,21	0,50	0,20	0,50
1,08	1,00	1,11	1,00
1,35	1,20	1,38	1,20
1,5	1,30	1,54	1,30
2,33	1,40	2,40	1,40
3,35	1,50	3,55	1,50
4,55	1,60	5,25	1,60
5,59	1,70	6,18	1,70
7,54	1,80	7,59	1,80
10,15	1,90	10,22	1,90
13,21	2,00	13,41	2,00
16,28	2,10	16,44	2,10
20,27	2,20	20,50	2,20
30,59	2,30	32,41	2,30
44,48	2,40	48,39	2,40
59,55	2,50	63,25	2,50
69,35	2,70	74,26	2,70
83,18	2,90	91,44	2,90
99,13	3,10	104,33	3,10
109,15	3,30	113,28	3,30
132,31	3,50	136,50	3,50
148,20	3,70	155,11	3,70
162,29	3,90	171,07	3,90
179,12	4,10	189,10	4,10
213,12	4,30	220,10	4,30
237,10	4,50	242,18	4,50

* So = 17,45 g/l, So' = 63,14 g/l

Tabla IV.2.- Consumo de base en experimento 2 con Alcalasa+Resinase (Eo/So=0,11 UA/g, Eo'/So'=0,83 kLU/g, T=50°C, pH=8,0) *

Experimento A (NaOH 2,46 N)		Experimento B (NaOH 2,46 N)	
t (min)	V _{NaOH} (ml)	t (min)	V _{NaOH} (ml)
0,00	0,00	0,00	0,00
0,19	0,50	0,22	0,50
1,34	1,00	1,40	1,00
1,55	1,10	2,11	1,10
2,28	1,20	2,48	1,20
2,42	1,30	3,25	1,30
3,16	1,40	3,58	1,40
3,41	1,50	4,31	1,50
4,59	1,60	5,19	1,60
6,19	1,70	7,09	1,70
8,04	1,80	9,54	1,80
9,55	1,90	10,59	1,90
12,21	2,00	12,51	2,00
15,18	2,10	15,34	2,10
19,33	2,20	19,25	2,20
22,59	2,30	23,17	2,30
25,17	2,40	27,12	2,40
30,15	2,50	32,05	2,50
39,23	2,70	43,13	2,70
46,31	2,90	49,36	2,90
52,23	3,10	58,37	3,10
59,33	3,30	69,23	3,30
76,19	3,50	82,39	3,50
87,41	3,70	99,40	3,70
102,13	3,90	105,16	3,90
135,54	4,10	144,52	4,10
166,22	4,30	170,39	4,30
209,51	4,50	216,12	4,50
235,37	4,70	243,15	4,70

* So = 17,45 g/l, So'=63,14 g/l

Tabla IV.3.- Consumo de base en experimento 3 con Alcalasa+Resinase (Eo/So=0,11
UA/g, Eo'/So'=1,11 kLU/g, T=55°C, pH=8,5) *

Experimento A (NaOH 2,46 N)		Experimento B (NaOH 2,46 N)	
t (min)	V _{NaOH} (ml)	t (min)	V _{NaOH} (ml)
0,00	0,00	0,00	0,00
0,15	0,50	0,16	0,50
1,15	1,00	1,07	1,00
1,35	1,10	1,25	1,10
1,51	1,20	1,48	1,20
2,12	1,30	2,09	1,30
2,30	1,40	2,27	1,40
3,08	1,50	3,01	1,50
3,50	1,60	3,33	1,60
4,59	1,70	4,51	1,70
5,48	1,80	5,32	1,80
8,32	1,90	8,22	1,90
11,29	2,00	11,19	2,00
13,38	2,10	13,44	2,10
17,42	2,20	18,02	2,20
19,57	2,30	19,43	2,30
25,18	2,40	24,06	2,40
31,15	2,50	29,55	2,50
39,52	2,70	38,44	2,70
46,12	2,90	46,10	2,90
58,41	3,10	57,27	3,10
73,03	3,30	65,23	3,30
94,14	3,50	90,24	3,50
109,33	3,70	107,20	3,70
129,29	3,90	130,17	3,90
139,51	4,10	142,23	4,10
158,30	4,30	155,18	4,30
192,15	4,50	190,54	4,50
219,19	4,70	217,30	4,70
242,12	4,90	242,09	4,90

* So = 17,45 g/l, So'=63,14 g/l

Tabla IV.4.- Consumo de base en experimento 4 con Alcalasa+Resinase (Eo/So=0,16 UA/g, Eo'/So'=0,55 kLU/g, T=55°C, pH=8,0) *

Experimento A (NaOH 2,46 N)		Experimento B (NaOH 2,46 N)	
t (min)	V _{NaOH} (ml)	t (min)	V _{NaOH} (ml)
0,00	0,00	0,00	0,00
0,24	0,50	0,20	0,50
1,13	1,00	1,14	1,00
1,29	1,10	1,30	1,10
1,48	1,20	1,50	1,20
2,09	1,30	2,12	1,30
2,32	1,40	2,38	1,40
3,30	1,50	3,41	1,50
4,03	1,60	4,13	1,60
4,57	1,70	5,07	1,70
5,59	1,80	6,09	1,80
8,05	1,90	8,15	1,90
10,15	2,00	10,15	2,00
13,08	2,10	13,39	2,10
16,22	2,20	16,41	2,20
19,38	2,30	19,58	2,30
23,56	2,40	24,16	2,40
27,59	2,50	28,47	2,50
36,12	2,70	36,52	2,70
46,15	2,90	46,55	2,90
58,19	3,10	59,10	3,10
70,29	3,30	72,44	3,30
81,15	3,50	84,19	3,50
113,44	3,70	119,40	3,70
137,28	3,90	140,37	3,90
150,34	4,10	159,16	4,10
185,34	4,30	191,49	4,30
218,22	4,50	222,41	4,50
250,56	4,70	253,15	4,70

* So = 17,45 g/l, So'=63,14 g/l

Tabla IV.5.- Consumo de base en experimento 5 con Alcalasa+Resinase (Eo/So=0,16
UA/g, Eo'/So'=0,83 kLU/g, T=55°C, pH=8,5) *

Experimento A (NaOH 2,46 N)		Experimento B (NaOH 2,46 N)	
t (min)	V _{NaOH} (ml)	t (min)	V _{NaOH} (ml)
0,00	0,00	0,00	0,00
0,15	0,50	0,13	0,50
1,06	1,00	0,42	1,00
1,27	1,10	0,59	1,10
1,44	1,20	1,15	1,20
2,12	1,30	1,40	1,30
2,28	1,40	2,18	1,40
2,59	1,50	2,49	1,50
3,39	1,60	3,40	1,60
4,19	1,70	4,22	1,70
5,23	1,80	5,33	1,80
7,31	1,90	6,51	1,90
11,29	2,00	11,09	2,00
14,09	2,10	14,28	2,10
18,31	2,20	18,44	2,20
24,49	2,30	25,12	2,30
28,58	2,40	29,58	2,40
37,45	2,50	37,55	2,50
49,25	2,70	48,25	2,70
59,52	2,90	59,33	2,90
73,09	3,10	68,11	3,10
83,22	3,30	79,29	3,30
1,35,15	3,50	95,45	3,50
109,32	3,70	119,11	3,70
131,19	3,90	135,59	3,90
145,11	4,10	153,11	4,10
157,33	4,30	170,33	4,30
179,40	4,50	191,40	4,50
199,12	4,70	209,12	4,70
219,18	4,90	223,18	4,90
241,52	5,10	242,52	5,10

* So = 17,45 g/l, So'=63,14 g/l

Tabla IV.6.- Consumo de base en experimento 6 con Alcalasa+Resinase (Eo/So=0,16 UA/g, Eo'/So'=1,11 kLU/g, T=50°C, pH=7,5) *

Experimento A (NaOH 2,46 N)		Experimento B (NaOH 2,46 N)	
t (min)	V _{NaOH} (ml)	t (min)	V _{NaOH} (ml)
0,00	0,00	0,00	0,00
0,10	0,50	0,14	0,50
0,30	1,00	0,38	1,00
0,35	1,10	0,46	1,10
0,45	1,20	0,54	1,20
0,55	1,30	1,07	1,30
1,12	1,40	1,16	1,40
1,27	1,50	1,24	1,50
1,49	1,60	1,32	1,60
2,19	1,70	2,09	1,70
4,24	1,80	2,44	1,80
6,55	1,90	5,45	1,90
9,29	2,00	8,19	2,00
12,08	2,10	12,08	2,10
16,31	2,20	16,12	2,20
20,28	2,30	20,34	2,30
25,32	2,40	25,39	2,40
30,45	2,50	31,25	2,50
38,15	2,70	37,13	2,70
45,32	2,90	44,39	2,90
55,23	3,10	54,29	3,10
61,51	3,30	69,11	3,30
78,12	3,50	77,22	3,50
93,11	3,70	90,12	3,70
109,13	3,90	102,23	3,90
129,15	4,10	122,43	4,10
142,33	4,30	138,23	4,30
168,22	4,50	158,12	4,50
182,29	4,70	175,27	4,70
199,12	4,90	190,10	4,90
213,18	5,10	209,11	5,10
229,23	5,30	222,09	5,30
250,33	5,50	247,23	5,50

* So = 17,45 g/l, So' = 63,14 g/l

Tabla IV.7.- Consumo de base en experimento 7 con Alcalasa+Resinase (Eo/So=0,21
UA/g, Eo'/So'=0,55 kLU/g, T=50°C, pH=8,5) *

Experimento A (NaOH 2,46 N)		Experimento B (NaOH 2,46 N)	
t (min)	V _{NaOH} (ml)	t (min)	V _{NaOH} (ml)
0,00	0,00	0,00	0,00
0,12	0,50	0,12	0,50
0,36	1,00	0,38	1,00
0,42	1,10	0,45	1,10
0,48	1,20	0,51	1,20
0,56	1,30	0,58	1,30
1,06	1,40	1,09	1,40
1,16	1,50	1,19	1,50
1,26	1,60	1,30	1,60
1,45	1,70	1,49	1,70
2,26	1,80	2,36	1,80
2,59	1,90	3,19	1,90
4,05	2,00	4,22	2,00
5,08	2,10	5,18	2,10
7,30	2,20	7,54	2,20
9,59	2,30	10,33	2,30
14,28	2,40	14,39	2,40
22,41	2,50	22,58	2,50
32,12	2,70	32,52	2,70
45,31	2,90	46,37	2,90
58,43	3,10	59,34	3,10
75,51	3,30	77,28	3,30
92,54	3,50	95,14	3,50
109,18	3,70	112,22	3,70
130,23	3,90	134,20	3,90
139,45	4,10	144,33	4,10
155,11	4,30	159,17	4,30
172,33	4,50	179,36	4,50
198,12	4,70	203,33	4,70
219,18	4,90	221,55	4,90
233,17	5,10	237,36	5,10
257,19	5,30	258,21	5,30

* So = 17,45 g/l, So'=63,14 g/l

Tabla IV.8.- Consumo de base en experimento 8 con Alcalasa+Resinase (Eo/So=0,21 UA/g, Eo'/So'=0,83 kLU/g, T=55°C, pH=7,5) *

Experimento A (NaOH 2,46 N)		Experimento B (NaOH 2,46 N)	
t (min)	V _{NaOH} (ml)	t (min)	V _{NaOH} (ml)
0,00	0,00	0,00	0,00
0,10	0,50	0,11	0,50
0,23	1,00	0,26	1,00
0,26	1,10	0,32	1,10
0,29	1,20	0,38	1,20
0,32	1,30	0,46	1,30
0,36	1,40	0,56	1,40
0,46	1,50	1,06	1,50
0,56	1,60	1,12	1,60
1,08	1,70	1,19	1,70
1,16	1,80	1,26	1,80
2,38	1,90	1,38	1,90
3,49	2,00	2,49	2,00
4,55	2,10	3,59	2,10
6,13	2,20	6,38	2,20
8,19	2,30	8,59	2,30
13,38	2,40	13,55	2,40
19,40	2,50	20,43	2,50
29,15	2,70	32,35	2,70
40,12	2,90	43,26	2,90
52,23	3,10	58,44	3,10
65,22	3,30	64,28	3,30
73,35	3,50	75,39	3,50
87,15	3,70	86,11	3,70
109,17	3,90	99,34	3,90
128,15	4,10	121,55	4,10
150,37	4,30	136,28	4,30
169,58	4,50	155,15	4,50
192,29	4,70	183,33	4,70
209,02	4,90	199,54	4,90
220,12	5,10	218,51	5,10
256,22	5,30	250,43	5,30

* So = 17,45 g/l, So' = 63,14 g/l

Tabla IV.9.- Consumo de base en experimento 9 con Alcalasa+Resinase (Eo/So=0,21
UA/g, Eo'/So'=1,11 kLU/g, T=45°C, pH=8,0) *

Experimento A (NaOH 2,46 N)		Experimento B (NaOH 2,46 N)	
t (min)	V _{NaOH} (ml)	t (min)	V _{NaOH} (ml)
0,00	0,00	0,00	0,00
0,10	0,50	0,11	0,50
0,21	1,00	0,21	1,00
0,24	1,10	0,23	1,10
0,27	1,20	0,26	1,20
0,30	1,30	0,29	1,30
0,35	1,40	0,34	1,40
0,40	1,50	0,39	1,50
0,46	1,60	0,45	1,60
0,52	1,70	0,51	1,70
1,00	1,80	0,59	1,80
1,08	1,90	1,07	1,90
1,16	2,00	1,18	2,00
1,26	2,10	1,30	2,10
1,36	2,20	1,48	2,20
2,10	2,30	2,15	2,30
2,42	2,40	2,52	2,40
3,45	2,50	3,55	2,50
5,35	2,70	5,55	2,70
7,32	2,90	7,20	2,90
9,41	3,10	10,39	3,10
14,51	3,30	15,23	3,30
22,12	3,50	25,18	3,50
32,17	3,70	37,27	3,70
48,36	3,90	53,11	3,90
63,16	4,10	70,22	4,10
82,16	4,30	85,19	4,30
105,22	4,50	104,32	4,50
132,24	4,70	134,29	4,70
158,11	4,90	160,24	4,90
181,47	5,10	189,33	5,10
206,16	5,30	209,13	5,30
229,17	5,50	231,49	5,50
242,55	5,70	245,28	5,70

* So = 17,45 g/l, So'=63,14 g/l

Tabla IV.10.- Residuo no solubilizado para los distintos experimentos con Alcalasa+Resinase

Experimento Nº	Residuo seco inicial (g)	Residuo seco final (g)	Porcentaje de Residuo no solubilizado (%)	Porcentaje de Residuo no solubilizado Media±Desviación estándar (%)
1 ^A	27,6534	2,3321	8,43	8,94±0,72
1 ^B	27,6675	2,6144	9,45	
2 ^A	27,7225	2,7681	9,99	10,03±0,05
2 ^B	27,8434	2,8003	10,06	
3 ^A	27,5423	2,3131	8,40	8,38±0,04
3 ^B	27,4807	2,2943	8,35	
4 ^A	27,4984	2,5889	9,41	9,00±0,58
4 ^B	27,5433	2,3663	8,59	
5 ^A	27,6032	1,8243	6,61	6,51±0,14
5 ^B	27,6620	1,7734	6,41	
6 ^A	27,6045	1,7513	6,34	6,09±0,36
6 ^B	27,5722	1,6078	5,83	
7 ^A	27,5592	1,7881	6,49	6,90±0,57
7 ^B	27,5228	2,0082	7,30	
8 ^A	27,5042	1,5312	5,57	5,27±0,42
8 ^B	27,4923	1,3663	4,97	
9 ^A	27,4808	1,6813	6,12	6,04±0,11
9 ^B	27,5967	1,6441	5,96	

¹Experimento A

²Experimento B

Tabla IV.11.- Proteína solubilizada para los distintos experimentos con Alcalasa+Resinase

Experimento Nº	Proteína inicial (g)*	Proteína solubilizada (g)*	Porcentaje de proteína solubilizada (%)	Porcentaje de proteína solubilizada Media±Desviación estándar (%)
1 ^A	5,2624	2,7710	52,66	52,61±0,07
1 ^B	5,2651	2,7670	52,55	
2 ^A	5,2756	2,6396	50,03	49,85±0,26
2 ^B	5,2986	2,6315	49,66	
3 ^A	5,2413	2,7927	53,28	53,31±0,03
3 ^B	5,2296	2,7887	53,33	
4 ^A	5,2329	2,6477	50,60	50,60±0,01
4 ^B	5,2415	2,6517	50,59	
5 ^A	5,2529	3,1030	59,07	58,90±0,25
5 ^B	5,2641	3,0909	58,72	
6 ^A	5,2531	3,5293	67,18	67,26±0,11
6 ^B	5,2470	3,5334	67,34	
7 ^A	5,2445	3,3881	64,60	64,53±0,10
7 ^B	5,2376	3,3760	64,46	
8 ^A	5,2341	3,4567	66,04	66,14±0,13
8 ^B	5,2318	3,4648	66,23	
9 ^A	5,2296	3,6342	69,49	69,31±0,26
9 ^B	5,2517	3,6302	69,12	

¹ Experimento A² Experimento B

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IV.12.- Colágeno no hidrolizado para los distintos experimentos con Alcalasa+Resinase

Experimento N°	Colágeno inicial (mg/g)*	Colágeno en fase sólida (mg/g)*	Porcentaje de colágeno no hidrolizado (%)	Porcentaje de colágeno no hidrolizado Media±Desviación estándar (%)
1 ^A	67,91	39,61	58,32	58,66±0,48
1 ^B	67,91	40,07	59,00	
2 ^A	67,91	41,60	61,25	61,28±0,04
2 ^B	67,91	41,64	61,31	
3 ^A	67,91	37,79	55,64	55,58±0,09
3 ^B	67,91	37,70	55,52	
4 ^A	67,91	40,85	60,15	60,25±0,14
4 ^B	67,91	40,99	60,35	
5 ^A	67,91	34,54	50,86	50,80±0,09
5 ^B	67,91	34,45	50,73	
6 ^A	67,91	31,44	46,29	46,30±0,02
6 ^B	67,91	31,45	46,31	
7 ^A	67,91	32,10	47,27	47,27±0,01
7 ^B	67,91	32,09	47,26	
8 ^A	67,91	31,68	46,65	46,68±0,04
8 ^B	67,91	31,72	46,71	
9 ^A	67,91	28,50	41,97	41,83±0,20
9 ^B	67,91	28,31	41,69	

¹Experimento A

²Experimento B

* Valores medios de análisis realizados por triplicado

Tabla IV.13.- Lípidos recuperados para los distintos experimentos con Alcalasa+Resinase

Experimento Nº	Lípidos iniciales (g)	Lípidos separados (g)	Porcentaje de lípidos recuperados (%)	Porcentaje de lípidos recuperados Media±Desviación estándar (%)
1 ^A	19,0560	16,3566	85,83	85,96±0,17
1 ^B	19,0657	16,4112	86,08	
2 ^A	19,1036	16,7534	87,70	86,44±1,78
2 ^B	19,1869	16,3422	85,17	
3 ^A	18,9794	17,3156	91,23	91,26±0,04
3 ^B	18,9369	17,2882	91,29	
4 ^A	18,9492	17,3126	91,36	91,24±0,17
4 ^B	18,9801	17,2944	91,12	
5 ^A	19,0213	18,0029	94,65	94,45±0,29
5 ^B	19,0619	17,9644	94,24	
6 ^A	19,0223	18,4877	97,19	97,02±0,25
6 ^B	19,0000	18,3997	96,84	
7 ^A	18,9910	18,1083	95,35	95,15±0,28
7 ^B	18,9659	18,0089	94,95	
8 ^A	18,9532	17,9836	94,88	94,97±0,12
8 ^B	18,9449	18,0072	95,05	
9 ^A	18,9370	18,4111	97,22	97,17±0,07
9 ^B	19,0169	18,4693	97,12	

¹Experimento A²Experimento B

Tabla IV.14.- Cantidad de ácidos grasos obtenida para para los distintos experimentos con Alcalasa+Resinase (mgácido/glípidos)

Ácido	Experimento 1			Experimento 2			Experimento 3			Experimento 4			Experimento 5		
	A*	B*	Media± Desviación	A*	B*	Media± Desviación	A*	B*	Media± Desviación	A*	B*	Media± Desviación	A*	B*	Media± Desviación
C14:0	23,94	24,29	24,12±0,25	24,16	24,46	24,31±0,21	26,74	26,40	26,57±0,24	26,30	26,83	25,56±0,87	26,79	28,59	27,69±1,27
C14:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C15:0	1,02	1,07	1,04±0,03	1,13	1,00	1,06±0,09	1,13	1,13	1,13±0,00	1,13	1,13	1,13±0,01	1,17	1,18	1,18±0,01
C15:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C16:0	167,65	165,00	166,32±1,87	174,60	154,35	164,48±14,32	193,46	194,25	193,85±0,36	192,76	186,46	189,61±4,45	211,46	192,92	202,19±13,11
C16:1	0,78	0,78	0,78±0,01	0,79	0,79	0,79±0,01	0,88	0,88	0,88±0,00	0,88	0,88	0,88±0,00	0,94	0,94	0,94±0,00
C17:0	14,46	14,27	14,37±0,13	15,84	14,94	15,39±0,64	16,68	16,74	16,71±0,05	16,45	16,36	16,41±0,06	17,44	17,70	17,57±0,19
C17:1	3,26	3,25	3,26±0,01	3,53	3,33	3,43±0,14	3,63	3,63	3,63±0,00	3,73	3,62	3,67±0,07	3,84	4,23	4,03±0,28
C18:0	116,99	118,67	117,83±1,19	120,51	120,51	120,51±0,01	125,11	125,12	125,12±0,01	123,59	122,23	122,91±0,96	128,96	129,50	129,23±0,28
C18:1n9c+t	204,61	207,52	206,17±2,06	211,38	209,83	210,61±1,10	215,99	215,99	215,99±0,01	219,14	219,10	219,12±0,03	221,81	213,66	217,73±5,76
C18:2n6c+t	114,78	114,81	114,79±0,02	115,68	115,73	115,71±0,03	123,10	123,10	123,10±0,01	123,86	123,94	123,90±0,06	126,39	121,74	124,07±3,29
C18:3n3	28,93	29,33	29,13±0,29	32,25	30,40	31,32±1,31	33,76	33,76	33,76±0,01	33,87	33,85	33,86±0,01	35,62	35,91	35,77±0,21
C18:3n6	0,43	0,40	0,41±0,02	0,41	0,33	0,37±0,05	0,46	0,45	0,45±0,01	0,46	0,46	0,46±0,00	0,47	0,46	0,46±0,01
C20:0	2,75	2,76	2,75±0,01	2,78	2,78	2,78±0,01	2,98	2,98	2,98±0,01	2,98	2,98	2,98±0,01	3,10	3,10	3,10±0,01
C20:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C20:2	24,57	24,92	24,74±0,25	25,24	25,17	25,21±0,05	26,50	26,56	26,53±0,05	26,48	26,57	26,53±0,07	27,11	27,12	27,11±0,01
C20:3n3	25,22	25,58	25,40±0,26	25,89	25,99	25,94±0,07	26,80	26,80	26,80±0,01	26,73	25,97	26,35±0,53	27,48	27,34	27,41±0,10
C20:3n6+c21:0	15,37	15,39	15,38±0,01	15,41	15,56	15,48±0,11	17,40	17,40	17,40±0,01	17,40	16,92	17,16±0,34	19,06	19,83	19,45±0,55
C20:4n6	14,45	14,43	14,44±0,01	15,90	14,99	15,44±0,64	17,31	17,31	17,31±0,01	17,64	17,14	17,39±0,35	18,61	17,94	18,27±0,48
TOTAL	759,19	762,47	760,93±2,32	785,48	760,16	772,83±17,91	831,93	832,51	832,21±0,41	833,38	824,45	827,91±6,31	870,26	842,16	856,21±19,87

A* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento A

B* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento B

Tabla IV.14.- Cantidad de ácidos grasos obtenida para para los distintos experimentos con Alcalasa+Resinase (mgácido/g_{lípidos}) (continuación)

Ácido	Experimento 6			Experimento 7			Experimento 8			Experimento 9		
	A*	B*	Media± Desviación	A*	B*	Media± Desviación	A*	B*	Media± Desviación	A*	B*	Media± Desviación
C14:0	28,25	29,00	28,63±0,53	28,22	27,77	27,99±0,32	28,03	27,70	27,87±0,23	28,08	28,53	28,30±0,32
C14:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C15:0	1,21	1,23	1,22±0,01	1,19	1,22	1,21±0,02	1,18	1,18	1,18±0,00	1,21	1,21	1,21±0,01
C15:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C16:0	212,65	209,38	211,01±2,31	211,97	210,53	211,25±1,02	201,24	198,25	199,74±2,12	216,01	215,97	215,99±0,03
C16:1	0,97	0,98	0,97±0,01	0,95	0,96	0,95±0,01	0,95	0,95	0,95±0,00	0,97	0,98	0,97±0,01
C17:0	17,88	17,97	17,93±0,06	17,26	17,41	17,33±0,11	17,69	17,59	17,64±0,07	18,03	18,04	18,03±0,01
C17:1	4,12	4,16	4,14±0,03	3,99	4,02	4,01±0,02	3,81	4,37	4,09±0,40	4,19	4,22	4,21±0,02
C18:0	130,02	129,62	129,82±0,28	129,14	129,05	129,10±0,07	128,93	129,43	129,18±0,36	138,00	127,91	132,95±7,14
C18:1n9c+t	230,79	227,25	229,02±2,51	219,17	210,79	214,98±5,92	220,13	214,68	217,40±3,85	237,88	236,24	237,06±1,16
C18:2n6c+t	132,70	132,85	132,77±0,11	131,86	132,46	132,16±0,42	125,43	132,39	128,91±4,92	132,73	132,76	132,75±0,02
C18:3n3	37,43	37,36	37,39±0,05	36,36	36,39	36,38±0,02	36,43	36,16	36,30±0,19	37,44	37,38	37,41±0,04
C18:3n6	0,50	0,50	0,50±0,01	0,51	0,49	0,50±0,02	0,48	0,49	0,48±0,01	0,51	0,50	0,50±0,01
C20:0	3,21	3,21	3,21±0,01	3,13	3,14	3,13±0,01	3,01	2,93	2,97±0,05	3,19	3,19	3,19±0,00
C20:1	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
C20:2	28,04	28,04	28,04±0,01	27,35	27,29	27,32±0,04	27,92	26,66	27,29±0,89	28,05	28,12	28,09±0,05
C20:3n3	27,93	27,50	27,72±0,30	27,88	27,78	27,83±0,07	27,08	27,37	27,23±0,20	28,35	28,15	28,25±0,14
C20:3n6+c21:0	19,90	20,69	20,29±0,55	19,21	19,08	19,15±0,09	18,09	17,83	17,96±0,19	19,79	20,11	19,95±0,23
C20:4n6	20,60	20,50	20,55±0,07	19,30	19,23	19,26±0,05	18,23	18,77	18,50±0,38	20,74	20,72	20,73±0,01
TOTAL	896,20	890,23	893,21±4,22	877,49	867,59	872,55±7,00	858,63	856,74	857,69±1,34	915,16	904,02	909,59±7,87

A* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento A

B* Valores medios de análisis realizados por triplicado en lípidos recuperados en el experimento B

