

**Evaluación de la Alcalasa estabilizada en soportes silíceos por el proceso sol-gel,
para la obtención de hidrolizados antioxidantes a partir de vísceras de tilapia**

Karen Julieth Colmenares Flórez

Universidad Nacional Abierta y a Distancia
Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería
Maestría en biotecnología de alimentos
Medellín, Colombia
Diciembre de 2022

Evaluación de la Alcalasa estabilizada en soportes silíceos por el proceso sol-gel, para la obtención de hidrolizados antioxidantes a partir de vísceras de tilapia

Karen Julieth Colmenares Flórez

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:

Magister en biotecnología de alimentos

Modalidad

Proyecto de Investigación

Director (a):

Ph. D Leidy Johanna Gómez Sampedro

Universidad Nacional Abierta y a Distancia

Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería

Programa de Maestría en biotecnología de alimentos

Medellín, Colombia

Diciembre de 2022

Declaración de derechos de propiedad intelectual

Los autores de la presente propuesta manifestamos que conocemos el contenido del Acuerdo 06 de 2008, Estatuto de Propiedad Intelectual de la UNAD, Artículo 39 referente a la cesión voluntaria y libre de los derechos de propiedad intelectual de los productos generados a partir de la presente propuesta. Asimismo, conocemos el contenido del Artículo 40 del mismo Acuerdo, relacionado con la autorización de uso del trabajo para fines de consulta y mención en los catálogos bibliográficos de la UNAD.

Agradecimientos

Expreso mis agradecimientos a mi familia por su apoyo en toda mi carrera, a la compañía donde laboro Duas Rodas Colombia, quienes me han apoyado con materiales técnicos, tiempo laboral para desempeñar las practicas en el laboratorio, a la universidad de Antioquia por confiar y facilitar los equipos y reactivos necesarios para todas las pruebas.

Agradezco a la doctora Leidy Johanna Gómez por su apoyo incondicional en el desarrollo de este proyecto, a mis compañeros de estudio Wilmar y Katherine por su apoyo incondicional en todo el curso y finalmente a todos mis tutores, porque de cada uno he ido fortaleciendo mis capacidades intelectuales, profesionales y personales.

*“Nunca consideres el estudio como una obligación,
si no como una oportunidad para comprender
el bello y maravilloso mundo del saber”*

Albert Einstein.

Resumen

El uso de enzimas a nivel industrial es limitado porque la mayoría de las enzimas tienen una vida útil baja y su reutilización es un desafío. La inmovilización es una técnica poderosa para superar estas desventajas y obtener biocatalizadores reutilizables con alta estabilidad. Esta investigación tuvo como objetivo determinar las condiciones óptimas para hidrolizar vísceras de tilapia roja (VTR) utilizando Alcalasa 2.4L inmovilizada (ALCI). Se realizó la encapsulación sol-gel de Alcalasa 2.4L y se utilizó un diseño experimental de superficie de respuesta central compuesto rotatable para identificar las mejores condiciones operativas para la enzima inmovilizada, utilizando como factores un pH entre 8 y 10 y una temperatura entre 50 y 70 °C y la actividad catalítica como variable de respuesta. Bajo las mejores condiciones de operación, se llevó a cabo la hidrólisis de proteínas de VTR y se comparó con la cinética de reacción de la enzima libre. Los resultados mostraron que las mejores condiciones para la reacción de la ALCI con el VTR fueron 70°C y pH 10, bajo las cuales se logró una GH de 14% con 3 horas de reacción. Por otro lado, se encontró que con la inmovilización, la Alcalasa pierde un 33% de su actividad catalítica. La mayor actividad antioxidante se logró con un DH de 18,7%, obteniendo valores de $901,10 \pm 15,01$ y $88,98 \pm 2,62$ para ABTS y FRAP, respectivamente. Estos resultados demuestran la viabilidad de utilizar Alcalase 2.4L inmovilizado obtener compuestos antioxidantes a partir de vísceras de pescado como estrategia de revalorización de estos productos, con un sistema que podría ser reciclado y reutilizado después del almacenamiento.

Palabras claves: Encapsulación sol-gel, hidrólisis de proteínas, Alcalasa 2.4L, proteasas.

Abstract

The use of enzymes at the industrial level is limited because most enzymes have a low shelf life and their reuse is challenging. Immobilization is a powerful technique to overcome these disadvantages and obtain reusable biocatalysts with high stability. This research aimed to determine the optimal conditions to hydrolyze red tilapia viscera (VTR) using immobilized Alcalase 2.4L (ALCI). Sol-gel encapsulation of Alcalase 2.4L was performed and a rotatable compound central response surface experimental design was used to identify the best operating conditions for the immobilized enzyme, using as factors a pH between 8 and 10 and a temperature between 50 and 70 °C and catalytic activity as response variable. Under the best operating conditions, VTR protein hydrolysis was carried out and compared with the reaction kinetics of the free enzyme. The results showed that the best conditions for the reaction of the ALCI with the VTR were 70°C and pH 10, under which a GH of 14% was achieved with 3 hours of reaction. On the other hand, it was found that with immobilization, Alcalase loses 33% of its catalytic activity, but improves its stability under reaction conditions compared to the free enzyme. The highest antioxidant activity was achieved with a DH of 18.7%, obtaining values of 901.10 ± 15.01 and 88.98 ± 2.62 for ABTS and FRAP, respectively. These results demonstrate the feasibility of using immobilized Alcalase 2.4L to obtain antioxidant compounds from fish viscera as a revaluation strategy for these products, with a system that could be recycled and reused after storage.

Keywords: Sol-gel encapsulation, protein hydrolysis, Alcalase 2.4L, Proteases.

Tabla de Contenido

Resumen	6
Abstract	7
Introducción	12
Planteamiento del problema	15
Justificación	17
Objetivos	19
Objetivo general	19
Objetivos específicos	19
Marco conceptual y teórico	20
Catálisis Enzimática y Su Aplicación A Nivel Industrial	20
Estabilización de enzimas mediante modificación del medio	21
Inmovilización	21
La Alcalasa	25
Hidrolisis enzimática	27
Bioactivos con propiedades antioxidantes	28
Metodología	31
Fase 1: Inmovilización De La Enzima	31
Fase 2: Acondicionamiento De Las Vísceras De Tilapia Roja	32
Fase 3: Actividad Catalítica De La Alcalasa 2.4L	33
Actividad Catalítica De La Alcalasa 2,4 L	33
Evaluación de las condiciones óptimas de hidrólisis	34
Reúso de enzima inmovilizada	35
Fase 4: Proceso De Hidrólisis Enzimática De Vísceras De Tilapia Roja	35
Grado De Hidrólisis (GH)	36
Fase 5: Actividad Antioxidante De Los Hidrolizados	37

Resultados y discusión	39
Fase 2: Acondicionamiento De Las Vísceras De Tilapia Roja	39
Caracterización de las vísceras	39
Fase 3: Actividad Catalítica De La Alcalasa 2.4L	40
Fase 4: Proceso De Hidrólisis Enzimática De Vísceras De Tilapia Roja	48
Fase 5: Actividad Antioxidante De Los Hidrolizados	50
Conclusiones	54
Referencias bibliográficas	55

Lista de tablas

Tabla 1. Diseño experimental para evaluar el efecto T y pH sobre la actividad catalítica de la Alcalasa 2.4L inmovilizada	34
Tabla 2. Composición proximal de las vísceras enteras y desengrasadas	39
Tabla 3. Curva patrón de tirosina a 660nm	41
Tabla 4. Actividad catalítica de enzima libre e inmovilizada	42
Tabla 5. Datos de diseño ortogonal para optimizar la enzima inmovilizada	43
Tabla 6. ANOVA modelo lineal	44
Tabla 7. Análisis de reúso de la alcalasa inmovilizada	47
Tabla 8. Actividades antioxidantes de hidrolizados de VTR preparados utilizando Alcalasa 2,4 L inmovilizado con diferentes GH según lo determinado por varios ensayos	51

Lista de figuras

Figura 1. Métodos de inmovilización de enzimática	22
Figura 2. Acondicionamiento de las vísceras de tilapia roja	32
Figura 3. Hidrolisis de vísceras de tilapia de pescado	36
Figura 4. Diseño experimental en diagrama 3D	45
Figura 5. Grado de hidrolisis vs tiempo.	48

Introducción

Las enzimas como moléculas catalizadoras de reacciones químicas, se las pueden definir en función de su acción catalítica. En el caso de las proteasas se clasifican dentro del Grupo 3 (hidrolasas), subgrupo 4, las cuales se caracterizan por catalizar la hidrólisis de enlaces tipo amida o “peptídicos” (C-N), presentando principalmente proteínas como sitio diana de hidrólisis (Vaseva *et al.*, 2012). Las proteasas son capaces de hidrolizar un enlace peptídico cuando la enzima polariza el grupo carbonilo asociado al enlace peptídico a nivel del sustrato y de esta forma puede estabilizar el átomo de oxígeno reactivo del grupo carbonilo asociado al enlace, volviendo así al carbono alfa del enlace peptídico vulnerable al ataque del nucleófilo activado de la enzima (Van der Hoorn, 2008). Estas enzimas se encuentran presente en todos los organismos vivos cumpliendo diversas funciones a nivel celular. Sus funciones abarcan desde los procesos generales de digestión de las proteínas de la dieta hasta procesos específicos y muy regulados, como la activación de zimógenos y modulación de la liberación de hormonas y otros productos bioactivos. Como consecuencia de sus diversas funciones y niveles en los que actúan, las proteasas tienen influencia en procesos de vital importancia como la proliferación y diferenciación celular, morfogénesis tisular, tratamiento de proteínas mal plegadas, neurogénesis, coagulación, procesos inflamatorios, homeostasis y apoptosis celular, entre otros (Fullana, 2014).

La hidrólisis enzimática de proteínas es una técnica biotecnológica que ha cobrado gran importancia, dado que constituye una estrategia efectiva para la obtención de hidrolizados y péptidos con propiedades tecnofuncionales y bioactivas (Halim *et al.*, 2016). Los péptidos bioactivos están encriptados en la proteína precursora, y es necesaria

una proteólisis para liberarlos, después de lo cual pueden desarrollar una o varias actividades biológicas (Gianfranceschi *et al.*, 2018). A diferencia de otras técnicas usadas para la hidrólisis de proteínas, la hidrólisis enzimática permite obtener hidrolizados con péptidos específicos y preservados (Tavano, 2013). Una de las bioactividades más explorada ha sido la actividad antioxidante, la cual se ha reportado en péptidos e hidrolizados obtenidos a partir de diferentes fuentes de proteínas (Cian *et al.*, 2011; Tejada *et al.*, 2020; Galazzi *et al.*, 2018). Sin embargo, una de las tendencias respecto a la obtención de compuestos bioactivos, es el uso de proteínas provenientes de subproductos de la industria alimentaria, lo que constituye una estrategia para su aprovechamiento y valorización. Por ejemplo, los subproductos piscícolas han sido ampliamente explorados para la obtención de hidrolizados antioxidante; a partir de vísceras de abulones (Je *et al.*, 2015), ostras (Umayaparvathi *et al.*, 2014), colágeno de salmón (Wu *et al.*, 2018), gelatina de escamas de tilapia nilótica (Ngo *et al.*, 2010), piel de calamar (Hamzeh, Benjakul, & Senphan, 2016), subproductos de trucha arcoíris (Suwal, Ketnawa, Liceaga, & Huang, 2018), entre otros.

Algunos de los desafíos para la industrialización de procesos enzimáticos, son mejorar la estabilidad de las enzimas y reducir el costo de su utilización, lo cual puede lograrse a partir de la inmovilización. El término inmovilización en la biotecnología se refiere al confinamiento de células, enzimas u otros organismos de manera que se encuentren localizadas dentro de cierta región, manteniendo propiedades biológicas para ser utilizadas tanto en la degradación como en la obtención de un producto determinado. Una gran variedad de procesos que son llevados a cabo mediante el uso de soportes de inmovilización. En los últimos años, la biotecnología ha tenido importantes avances en la

aplicación de estos. Por ejemplo, los procesos industriales para la obtención de productos químicos, alimentarios y farmacéuticos, así como en el área ambiental (Meneau *et al.*, 2020).

Se ha encontrado que la técnica de encapsulación es la más exitosa para superar las limitaciones como por ejemplo: el costo de aislar y purificar enzimas, debido a que son estructuras inestables y sensibles a las condiciones del proceso; y la mayoría de las enzimas se disuelven en agua en sistemas catalíticos homogéneos, por lo que contaminan el producto y no pueden reciclarse en la forma activa de las mezclas de reacción porque, en comparación con las enzimas libres en solución, las enzimas encapsuladas se separan fácilmente y se pueden reutilizar varios ciclos con poca pérdida de actividad (Thu & Krasaekoopt, 2016). El alginato es ampliamente utilizado como material de soporte para la encapsulación de enzimas, porque la encapsulación dentro del gel de alginato de calcio es rápida, no tóxica, altamente biocompatible, económica y estable en un pH ácido, por lo tanto, se utiliza en muchas aplicaciones como material de soporte para liberar y encapsular células y enzimas en las industrias farmacéutica y alimentaria (Thu & Krasaekoopt, 2016).

Con respecto a lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar la estabilización de la Alcalasa en soportes silíceos a través de la inmovilización por el proceso sol-gel para su aplicación en la obtención de péptidos antioxidante a partir de vísceras de tilapia.

Planteamiento del problema

La pesca y la acuicultura son actividades productivas que se desarrollan a lo largo de las costas del Pacífico y el Atlántico de Colombia, así como en las aguas interiores, especialmente en las principales cuencas de los ríos Magdalena, Amazonas, Orinoco y Sinú, donde se captura el pescado para su consumo como alimento (OCDE, 2016). Entre el 2011 y 2020 la producción acuícola aumentó 216% pasando de 82.622 a 179.351 toneladas entre tilapia, trucha, cachama, camarón y otras especies nativas (Minagricultura, 2020), este crecimiento de la cadena piscícola trae consigo un aumento en los residuos y subproductos generados en el proceso de alistamientos de los peces, subproductos que pueden representar entre un 50 y 70% del peso del animal (Villamil *et al.*, 2017). Uno de los residuos más abundantes de la cadena piscícola es las vísceras de pescado, las cuales en este animal de agua dulce constituyen entre el 5 y 11% del peso corporal y su composición química promedio es 67% agua, 10% proteína, 14% extracto etéreo y 3% minerales (Pinzón *et al.*, 2016). Según el estudio hecho por Torres y Grandas del 2017 se proyectó la producción de desechos en la industria piscícola, en el 2020 de 8.712 toneladas de desechos acumulados en Colombia, además las concentraciones de amonio (compuesto nitrogenado que es producto de la excreción de los peces) en las proximidades de jaulas, que producen crecimiento de microalgas, estos compuestos se convierten en nutrientes del medio y generan lo que se conoce como fenómeno de eutrofización (contaminación), este causa cambios en la diversidad, genera desequilibrio, incremento en la intensidad y frecuencia de floraciones algales y interrupciones de funciones ecosistémicas (Torres & Granda, 2017). Los altos volúmenes de residuos generados, y la pobre gestión y aprovechamiento de estos, hace necesario la

implementación de alternativas de revaloración; dentro de este aprovechamiento una de las alternativas altamente valoradas es la hidrólisis enzimática, es la más ventajosa debido que en el proceso hay mayor control y selectividad, además, éste es menos drástico y genera un producto de mayor valor nutricional (Zapata & Gutiérrez, 2017). Pero la producción de lotes de hidrolizados de proteína posee aun ciertas desventajas asociadas a: alto costo de enzimas utilizadas las cuales no pueden ser reutilizadas, dificultad para controlar la extensión de la reacción que puede generar productos no homogéneos, bajos rendimientos, y la necesidad de inactivar la enzima al final de la reacción mediante un cambio en el pH o por medio de tratamiento térmico, lo que añade costos al proceso (Saavedra, 2016). Por esta razón, en el presente proyecto se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Como se ve afectada la actividad de la Alcalasa tras la estabilización en soportes silíceos por el proceso sol-gel, para la obtención de hidrolizados antioxidantes a partir de subproductos de pesca como las vísceras de tilapia?

Justificación

La pesca y la acuicultura son en conjunto uno de los sectores productivos en que se genera gran cantidad de residuos; dentro de los cuales se encuentra los desechos de las vísceras de pescado. Las cuales son una fuente significativa de proteínas, lo que permite la obtención de hidrolizados o péptidos específicos con propiedades funcionales y bioactivas, con un gran potencial como ingredientes de valor agregado para la industria farmacéutica o alimentaria, por ser considerados seguros, nutricionalmente saludables, de bajo costo y con beneficios terapéuticos (Calamaya *et al.*, 2018). Sin embargo, en este proceso es necesario el uso de enzimas y más propiamente proteasas que llevan a cabo el proceso de hidrólisis para la obtención de los péptidos, la producción de lotes de hidrolizados de proteína posee aun ciertas desventajas asociadas a: alto costo de enzimas utilizadas las cuales no pueden ser reutilizadas, por tal, razón se hace necesario superar esta desventaja con el fin de que el proceso sea viable en términos de costos (Saavedra, 2016).

En este sentido, la inmovilización enzimática tiene varias ventajas, como: el aumento de la estabilidad de la enzima y la reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costos del proceso (Meneau *et al.*, 2020). Teniendo en cuenta lo anterior, la estabilización de la Alcalasa a través del proceso de inmovilización permitirá mayor estabilidad en las condiciones de reacción y permitirá su recuperación del medio de reacción, para su uso continuo en el medio de reacción. Sin embargo, el proceso de inmovilización puede generar pérdida de la actividad catalítica de la enzima, por lo que tras el proceso de inmovilización es necesario verificar la capacidad catalítica y habilidad para la producción de hidrolizados antioxidantes (Marín, 2013). Teniendo en cuenta lo

anterior, en la presente investigación se propuso diseñar un biocatalizador heterogéneo a través de la inmovilización de la Alcalasa, por medio del proceso sol-gel, y evaluar su actividad catalítica y capacidad de producción de hidrolizados antioxidantes a partir de las vísceras de tilapia. Esta propuesta nació como un acercamiento entre la Universidad Nacional Abierta y a Distancia y la Universidad de Antioquia, buscando consolidar la red interinstitucional mediante la generación de conocimiento de alta calidad.

Objetivos

Objetivo general:

Evaluar la estabilización de la Alcalasa en soportes silíceos a través de la inmovilización por el proceso sol-gel para su aplicación en la obtención de hidrolizados antioxidantes a partir de vísceras de tilapia.

Objetivos específicos:

Determinar la actividad catalítica de la Alcalasa inmovilizada en soportes silíceos en comparación con la enzima libre.

Evaluar el comportamiento del biocatalizador en las condiciones de operación (como por ejemplo pH, temperatura, tiempo, grado de hidrolisis alcanzado) de la hidrólisis de las vísceras.

Aplicar el biocatalizador en la obtención de hidrolizados antioxidantes por medio de la hidrolisis de proteínas de las vísceras de tilapia roja.

Marco conceptual y teórico

Catálisis Enzimática Y Su Aplicación A Nivel Industrial

Las enzimas son catalizadores biológicos que presentan alta quimio-, regio- y estéreo - selectividad, actúan bajo condiciones suaves (fisiológicas), son más eficientes y amigables con el medio ambiente que los catalizadores químicos (son biodegradables, y permiten obtener productos de valor agregado sin la necesidad de usar reactivos o procesos que son muy contaminantes). La interacción del sustrato y el sitio activo de la enzima, los cuales son complementarios tanto a nivel geométrico electrónico, ocurre a través de interacciones electroestáticas, hidrofóbicas, tipo Van der Waals y enlaces de hidrógeno y están afectadas por la movilidad conformacional de la enzima (Perry & Hegeman, 2007).

El interés de usar las enzimas a nivel industrial se ha incrementado en los últimos años, debido a que, con su uso se puede evitar las altas temperaturas, el uso de solventes, y los pH extremos en los diferentes procesos, y también estos ofrecen alta selectividad, lo que reduce el impacto ambiental (Cherry & Fidantsef, 2003). Su uso ha sido reportado en la industria alimenticia, en la producción de quesos, vinos, cervezas, etc., en la manufactura de telas, en la producción de detergentes (Mukherjee & Rai, 2008), en la conversión de un desecho en un producto de valor agregado y en la síntesis de una gran variedad de compuestos en el campo de la síntesis química (Kirk & Fuglsang, 2002). Sin embargo, para que su aplicación industrial sea viable es necesario garantizar su estabilidad bajo condiciones reactivas.

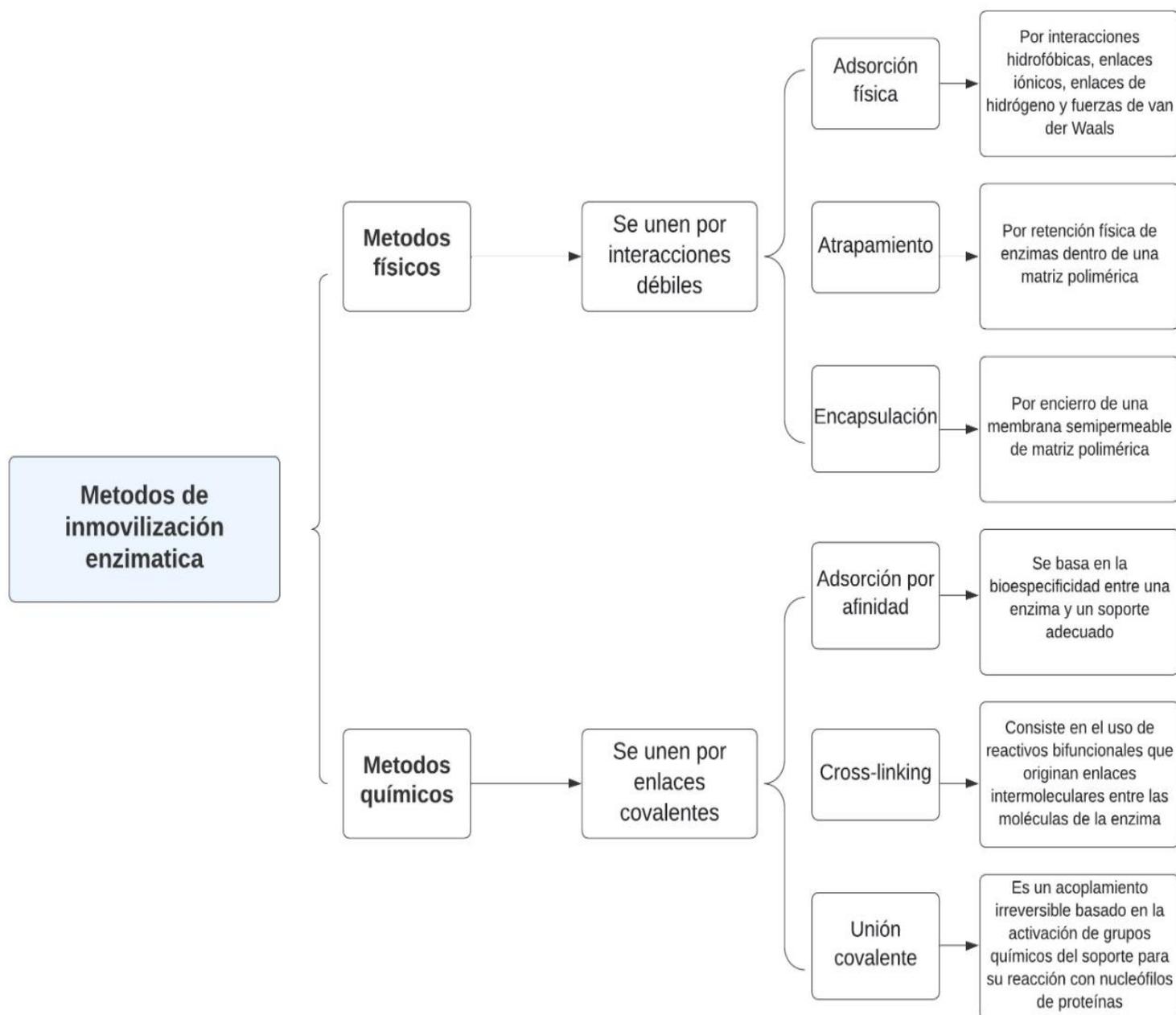
Estabilización de enzimas mediante modificación del medio

Las enzimas son polielectrolitos anfotéricos cuya carga neta (aniónica o catiónica) y estabilidad coloidal dependen del pH y los componentes del medio. Su desnaturalización o pérdida del alto grado de orden de la estructura secundaria y terciaria se puede evitar con la presencia de aditivos en el medio tales como líquidos iónicos (Lee *et al.*, 2007), sacáridos (Wei *et al.*, 2000) y surfactantes.

Inmovilización

La inmovilización es el proceso de inclusión física o unión química de la enzima en un soporte, el cual puede ser de naturaleza orgánica, inorgánica e híbrida (Kim *et al.*, 2006). Puede llevarse a cabo al mismo tiempo que se sintetiza el soporte o en soportes ya sintetizados. Los soportes inorgánicos ofrecen ventajas con respecto a los orgánicos, ya que poseen alta resistencia mecánica y al ataque por microorganismos, así como estabilidad térmica facilidad de manejo y larga vida útil. Algunos de los más utilizados son los óxidos porosos, tales como sílica (SiO_2), alúmina (Al_2O_3), aluminosilicatos, dióxido de titanio (TiO_2) y dióxido de zirconio (ZrO_2). Las características fisicoquímicas de estos materiales porosos se pueden modular fácilmente durante o después de su síntesis (Pierre, 2004). Los métodos de inmovilización de enzimas se pueden clasificar como reversibles e irreversibles dependiendo de la fuerza de unión de la enzima al soporte. Además, se pueden clasificar en función de un método físico o químico utilizado para la inmovilización, como se presenta esquemáticamente en la Figura 1.

Figura 1. Métodos de inmovilización de enzimática. Fuente: El autor



La adsorción física involucra interacciones débiles tales como enlaces de hidrogeno y fuerzas de van der Waals o electrostáticas entre la enzima y el soporte. Por lo

tanto, esta ruta es simple, poco costosa y no desnaturalizante, sin embargo, este método presenta una gran desventaja relacionada con la lixiviación de la enzima desde el soporte durante su uso. Con el fin de superar esta desventaja se puede modificar el soporte poroso con diferentes grupos funcionales que permitan la unión química de la enzima, sin embargo se debe tener en cuenta que esta ruta puede distorsionar su estructura natural, las características del microambiente y restringir la libertad conformacional de la enzima (importante para su actividad catalítica) y que la presencia de especies reactivas y solventes durante su inmovilización pueden conducir a su desnaturalización (Meneau *et al.*, 2020).

Otro método de inmovilización, conocido como encapsulación, es la ruta mediante la cual la enzima es atrapada o confinada en el interior de los poros del soporte, luego de ser adsorbido, mediante procesos que permiten reducir el tamaño de la entrada del poro (Figura 1) de la tal forma que evite la lixiviación de la enzima pero que permita el flujo libre de sustratos y productos (Carteret *et al.*, 2005).

La encapsulación también puede llevarse a cabo durante la síntesis del soporte (Carteret *et al.*, 2005), constituyéndose en una ruta directa y menos costosa con respecto a las demás metodologías de inmovilización, que puede ofrecer estabilidad operacional a largo plazo, siempre y cuando no se afecte la estabilidad intrínseca de la enzima durante el proceso de encapsulación. Si la red inorgánica u orgánica formada alrededor de la enzima es a su vez porosa, pero con un diámetro de poro tal que evite la lixiviación de la enzima, habrá una libre difusión de sustratos y productos (Bernal *et al.*, 2007). El proceso sol-gel ha sido una de las metodologías usadas para la estabilización de enzimas por

encapsulación, ya que este puede llevarse a cabo a bajas temperaturas sin afectar la enzima (Balti *et al.*, 2010; Nichele *et al.*, 2011).

El proceso de sol-gel implica la formación de un gel a partir de partículas coloidales dispersas en un medio líquido (sol), a temperatura por debajo del punto de ebullición del solvente, que generalmente es agua. En la producción de sílica, el “sol” es formado a partir de precursores alcóxidos como el tetrametilortosilicato (TMOS) o tetraetilortosilicato (TEOS) (Gupta & Chaudhury, 2007) en medio acuoso, en el cual sufren procesos de hidrólisis y condensación. Ambas reacciones ocurren mediante sustitución nucleofílica y debido a la baja densidad de carga de los átomos de silicio ($\delta^+=0.32$) es necesario el uso de catalizadores ácidos o básicos, por lo tanto, la rata de hidrólisis y condensación dependen del pH del medio y pueden ser controladas independientemente (Lupano, 2013).

Los factores que afectan el proceso sol-gel de sílica son el pH, la temperatura y la composición del medio de reacción, debido a que estos controlan la policondensación de las especies silíceas y las interacciones entre el surfactante y las mismas, si el surfactante está presente en el medio de síntesis (Nelms *et al.*, 1992). Los soportes inorgánicos a base de sílice como el dióxido de silicio y el tetraóxido de silicio se utilizan, generalmente, para la inmovilización de enzimas. Existen polímeros que presentan los grupos SiO₄ rígidos pero los grupos SiO₂ son flexibles, además de esto presentan sitios hidrófilos como hidrófobos que le confieren propiedades de adsorción muy complejas (Meneau *et al.*, 2020).

De acuerdo con lo expuesto hasta el momento, se puede concluir que para la encapsulación de enzimas por medio del proceso sol-gel se debe tener en cuenta:

El pH de síntesis debe ser compatible con la estabilidad enzimática.

El proceso debe llevarse a cabo a una temperatura en la cual se mantenga la conformación activa de la enzima.

Las características porosas de la matriz deben ser tales que se evite la lixiviación de la enzima, pero que se dé la difusión de sustrato y producto.

Las características de la matriz para que la aplicación del biocatalizador sea viable (estabilidad en condiciones reactivas).

La Alcalasa

La Alcalasa 2.4 L es una enzima proteolítica producida por fermentación sumergida de una cepa seleccionada de *Bacillus Licheniformis*, cuyo principal componente enzimático es la Subtilisina Carlsberg, una serinproteasa alcalina preparada y cristalizada por primera vez por Guntelberg y Ottesen en 1952, que es activa a temperaturas cercanas a 60 °C y en pH neutros o ligeramente alcalinos entre 7 a 10 (Baez *et al.*, 2016). La Subtilisina Carlsberg consiste en una cadena peptídica de 274 aminoácidos sin enlaces disulfuro cuyo peso molecular es de 27,3 kDa y su punto isoeléctrico de 9,4. La enzima tiene baja especificidad, hidrolizando la mayoría de los enlaces peptídico, preferentemente aquellos que contienen residuos de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos (Doucet *et al.*, 2003). Como todas las serinas proteasas, la Subtilisina Carlsberg tienen un mecanismo de catálisis que requiere una tríada de aminoácidos en su sitio activo; un residuo de serina (de ahí el nombre familiar) actúa

como el nucleófilo primario para el ataque del enlace peptídico, y la nucleofilia de este grupo se potencia por interacciones específicas con una cadena lateral de histidina, que a su vez interactúa con una cadena lateral de aspartato (Copeland, 2000). Estas enzimas catalizan la hidrólisis de los enlaces éster y peptídicos a través del mismo mecanismo de transferencia de acilo, con una aceleración de velocidad de 10⁹ veces o más con respecto a la reacción no catalizada. Después de la formación del complejo ES, el carbono carbonilo del enlace peptídico escindible (P1) es atacado por la Ser del sitio activo, formando un intermedio tetraédrico con un centro oxianiónico en el carbono carbonílico que es altamente reminiscente al estado de transición de la reacción. Este estado de transición se estabiliza mediante interacciones específicas de enlaces hidrógeno entre los grupos NH de la Ser 195 y la cadena lateral de Asn 155 con el centro oxianión del sustrato. El estado de transición luego decae a medida que se dona un protón de la His del sitio activo, al grupo amino del residuo que está en el lado C-terminal del enlace hidrolizable (P1'), seguido de la disociación del primer producto de la reacción, el péptido que comienza en P1' y la formación simultánea de un intermedio covalente con un grupo acilo (desde P1) unido a la Ser del sitio activo. La enzima es luego desacilada por ataque nucleofílico, mediante una molécula de agua que ingresa al sitio activo de la enzima desde la cavidad resultante de la salida del primer producto peptídico. La reacción de desacilación continúa con la formación de otro estado de transición tetraédrico, muy similar al que se formó durante la reacción de acilación y envuelve los mismos enlaces de hidrogeno estabilizantes con la enzima. Este estado de transición decae con la transferencia de protones a la His del sitio activo y la liberación del segundo producto peptídico que tiene el grupo P1 en su extremo carbonilo (Copeland, 2000).

La actividad catalítica de la Alcalasa 2.4 L se determina mediante un análisis estándar usando caseína como sustrato, según la metodología descrita por Cheung *et al.*, 2012 en este análisis, una unidad de actividad es representada por una producción de color equivalente a 1 μmol de tirosina por min a pH 7,5 y 37°C.

La Alcalasa 2.4 L ha sido identificada por diferentes autores como una enzima altamente eficiente para producir hidrolizados con altos GH y péptidos con diversas actividades biológicas, a partir de proteínas alimentarias marinas (Balti *et al.*, 2010; Je *et al.*, 2015; Najafian & Babji, 2014; Villamil *et al.*, 2017). Proporcionando altos rendimientos y desarrollando péptidos más cortos, y por ende más resistentes a las enzimas digestivas (Sarmadi & Ismail, 2010).

Hidrolisis enzimática

Las hidrólisis enzimáticas, son reacciones catalizadas por proteasas o enzimas proteolíticas, una importante clase de enzimas usadas para catalizar la rotura de los enlaces pépticos de las proteínas, produciendo péptidos o incluso aminoácidos libres; adicionalmente, las enzimas presentan especificidad sobre el sustrato, lo cual permite el desarrollo de hidrolizados proteicos con características definidas (Tavano, 2013). Por esta razón, la hidrólisis enzimática es la técnica más común y mayormente utilizada para producir hidrolizados bioactivos (Halim *et al.*, 2016).

La hidrólisis enzimática de proteínas transcurre a través de un conjunto de etapas en serie, dando péptidos de tamaño decreciente: Proteínas \rightarrow proteosomas \rightarrow peptonas \rightarrow péptidos \rightarrow aminoácidos. Se trata de un conjunto de reacciones simultáneas de rotura de

enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio. Se propone un proceso de hidrólisis constituido por tres reacciones consecutivas. Primero la formación de un complejo enzima- proteína, después la ruptura del enlace peptídico dando como resultado la liberación de un péptido, finalmente el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El proceso puede iniciarse nuevamente sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno de ellos (Benítez *et al.*, 2008).

Bioactivos con propiedades antioxidantes

Los radicales libres son átomos, moléculas o iones con electrones desapareado, que son altamente inestables y activos hacia reacciones químicas con otras moléculas, que tienden a capturar electrones de moléculas biológicas estables para estabilizarse ellos mismos (Carocho & Ferreira, 2013). Un antioxidante puede ser definido como “una sustancia que cuando está presente en bajas concentraciones, comparado con la concentración de un sustrato oxidable, reduce o previene significativamente la oxidación de este sustrato” (Carocho *et al.*, 2018). Esta definición es universal y puede emplearse para definir los antioxidantes que combaten los radicales libres dentro de nuestros cuerpos o cuando se utilizan como aditivos alimentarios.

Los antioxidantes juegan un rol vital para reducir procesos oxidativos, tanto en sistemas alimentarios como en el cuerpo humano. En los sistemas alimentarios son útiles para retardar la peroxidación lipídica y la formación de productos de peroxidación secundarios, así como para ayudar a mantener sabor, textura y en algunos casos color de los productos alimentarios durante el almacenamiento (Samaranayaka & Li-Chan, 2011). En cuanto a los radicales libres a nivel fisiológico, cuando hay sobre - producción de los

mismo, si no se neutralizan a tiempo, pueden llevar a enfermedades como Alzheimer, Parkinson, diabetes, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, hipertensión, infertilidad, asma, alergias e insuficiencia cardíaca (Carocho *et al.*, 2018). En condiciones normales, el sistema de defensa puede eliminar las especies reactivas a través de antioxidantes endógenos enzimáticos y no enzimáticos. Sin embargo, en ciertas circunstancias, el sistema de defensa endógeno no es suficiente para proteger el cuerpo contra los radicales y necesita antioxidantes exógenos provenientes de la dieta para evitar un estado de estrés oxidativo (Sarmadi & Ismail, 2010).

Péptidos con capacidad antioxidante obtenidos de diferentes proteínas alimentarias han sido encontrados y su actividad biológica ha sido ampliamente estudiada desde que el efecto fue reportado por primera vez por Marcuse en 1960 (Sarmadi & Ismail, 2010). Aunque proteínas de diferentes fuentes pueden usarse como precursores de péptidos antioxidantes, el uso de subproductos acuícolas para la obtención de dichos péptidos se ha convertido en un tema de gran interés para la industria farmacéutica, de alimentos nutraceuticos y aditivos alimentarios (Sila & Bougatef, 2016). Muchos estudios se han realizado al respecto, y se han obtenido hidrolizados y péptidos con potente actividad antioxidante a partir de vísceras de abulones (Je *et al.*, 2015), ostras (Umayaparvathi *et al.*, 2014), colágeno de salmón (Wu *et al.*, 2018), gelatina de escamas de tilapia nilótica, piel de calamar (Hamzeh *et al.*, 2016), subproductos de trucha arcoíris (Suwal *et al.*, 2018), entre otros.

En general los péptidos antioxidantes contienen entre 2-16 residuos de aminoácidos y se ha reportado que la actividad antioxidante de péptidos con peso molecular entre 500-1500 Da, es mayor que la de péptidos por encima de 1500 Da y

péptidos menores a 500 Da (Sarmadi & Ismail, 2010). Muchos otros factores pueden influenciar la actividad antioxidante de péptidos bioactivos, como por ejemplo las condiciones operacionales aplicadas para aislar las proteínas, la naturaleza de la proteína, la especificidad de la proteasa usada, la estructura y concentración del péptido (Sila & Bougatef, 2016).

Metodología

Fase 1: Inmovilización De La Enzima

El trabajo de investigación se realizó en el marco de un proyecto de investigación, en el cual otro grupo de investigadores estuvieron a cargo de la inmovilización y caracterización de la enzima inmovilizada. Para lo cual, en un procedimiento típico, se disolvió 1 g de ortosilicato de tetraetilo (TEOS) en 2 ml de HCl (aproximadamente pH 3,5). Esta solución se mezcló en una proporción de volumen 1:1 con una solución enzimática tamponada (tampón fosfato pH 7 25 mM hasta pH final 5,5), que contenía 2 UA/ L y 1×10^{-3} M Triton X- 100. Posteriormente se añadió polietilenimina (PEI) hasta una concentración final de 10 % v/v. El sol de sílice obtenido se mantuvo en agitación orbital (250 rpm) a 25°C durante 30 min. La gelificación se realizó en recipientes sellados, durante 24 h a 40°C. Finalmente, los biocatalizadores heterogéneos obtenidos se enjuagaron con solución tampón de fosfato pH 7 25 mM y se almacenaron a 4°C.

El rendimiento de encapsulación en términos de actividad (YA) se calculó mediante la ecuación 1. Donde AI es la actividad expresada por el biocatalizador encapsulado por gramo de soporte, y AC es la actividad enzimática libre ofrecida por gramo.

$$\text{Eficiencia de encapsulación (Ya)} = Ai/Ac * 100 \quad (1)$$

Fase 2: Acondicionamiento De Las Vísceras De Tilapia Roja

El acondicionamiento de las vísceras de tilapia roja es importante realizarse, para preparar el medio para el proceso de hidrolisis, también es importante realizarse la inactivación de enzimas endógenas para un mejor control del proceso.

Las vísceras de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) se obtuvieron en la cadena de frío de la Piscícola el Gaitero (Antioquia), tomando muestras de lotes de producción diferentes. Las vísceras fueron homogenizadas en un procesador de alimentos (Quick'n Easy, Black&Decker, USA), calentadas a 90 °C por 20 minutos para inactivar las enzimas endógenas y favorecer la separación de la grasa, y posteriormente se enfriaron en condiciones sucesivas de 25 °C por 20 minutos, 4 °C por 40 minutos y -20 °C durante 24 horas. Pasadas las 24 horas, la fracción acuosa fue separada de la grasa y almacenadas por aparte a -20 °C hasta el momento de la hidrólisis.

En la figura 2 se evidencia el proceso de acondicionamiento de las vísceras de la tilapia roja.

Figura 2. Acondicionamiento de las vísceras de tilapia roja. Fuente: el autor



Fase 3: Actividad Catalítica De La Alcalasa 2.4L

Se evaluó la actividad catalítica de la enzima libre e inmovilizada, con el fin de identificar si hay cambio en la actividad catalítica después de la inmovilización.

Actividad Catalítica De La Alcalasa 2,4 L

Se analizó la actividad catalítica de la enzima inmovilizada y libre y se empleó un diseño experimental completamente al azar con un factor de dos niveles (enzima libre y enzima inmovilizada), por medio del software Design Expert 11, para identificar la diferencia de medias. La actividad catalítica se determinó mediante un análisis estándar usando caseína como sustrato, según la metodología descrita por Cheung *et al* (2012). En este análisis, una unidad Anson (UA) de actividad es representada por una producción de color equivalente a 1 μmol de tirosina por min a pH 7,5 y 37°C. Para esto, una alícuota de 100 μL de las enzimas (enzima libre 1:20 y enzima inmovilizada 1:10) se incubó con 500 μL de solución de caseína 0,65 %, durante 10 minutos a 37°C. La reacción se detuvo adicionando 500 μL de solución de ácido tricloro acético (110 mM) y la mezcla se centrifugó 7500rpm por 10 minutos, para tomar 200 μL del sobrenadante y mezclarlos con 500 μL de Na_2CO_3 0,5M y 100 μL del reactivo de Folin- Ciocalteu. Esta última solución se incubó a 37°C por 30 minutos, se centrifugó a 9000 rpm por 15 minutos y la absorbancia se leyó en un espectrofotómetro a 660nm. Como patrón se emplea una curva estándar de solución de Tirosina entre 0-200 mg/L, y los resultados se reportan en UA/ g de enzima.

Evaluación de las condiciones óptimas de hidrólisis

Se planteó un diseño experimental de superficie de respuestas central compuesto para evaluar las condiciones óptimas de hidrólisis de las vísceras de tilapia roja (VTR) con la Alcalasa 2.4L inmovilizada. Para el diseño se usaron los factores el pH (7-10) y una temperatura (40-70°C), teniendo como variable respuesta la actividad catalítica. Se desarrollaron 13 experimentos de acuerdo con el diseño experimental mostrado en la tabla 1. Se empleó el software Design- Expert® 8.0.5 (Stat-Ease, EE. UU.) en la generación y análisis de los datos del diseño.

Tabla 1. Diseño experimental para evaluar el efecto T y pH sobre la actividad catalítica de la Alcalasa 2.4L inmovilizada. Fuente: el autor.

Corrida	T (°C)	pH
1	70	8,5
2	55	8,5
3	70	10
4	70	7
5	40	10
6	55	8,5
7	55	10
8	40	7
9	55	8,5
10	55	7
11	55	8,5
12	40	8,5
13	55	8,5

Adicional, se llevó a cabo la optimización del modelo polinomial obtenido, para determinar las condiciones de T y pH que maximizan la actividad catalítica de la Alcalasa inmovilizada, empleando la metodología de superficie de respuesta. El ajuste del modelo empírico se verificó a la luz de los resultados experimentales, realizando tres replicas experimentales y comparando estos resultados con los predichos por el modelo polinomial ajustado.

Reúso de enzima inmovilizada

Para la verificación del reúso de la Alcalasa 2.4 L inmovilizada, se evaluó la actividad catalítica de la enzima, una vez finalizado el análisis, la enzima se recuperó por centrifugación y enjuagó con agua destilada, evaluando nuevamente la actividad de la enzima. Este procedimiento se repitió 3 veces para determinar la actividad catalítica de la enzima en cada ciclo.

Fase 4: Proceso De Hidrólisis Enzimática De Vísceras De Tilapia Roja

La hidrólisis se realizó con Alcalasa 2,4 L libre e inmovilizada, en un reactor de 500 mL, con control de pH y temperatura por medio de un electrodo de vidrio combinado conectado a un titulador automático. Se trabajó bajo condiciones de temperatura y pH establecidas como óptimas en el diseño experimental (70 °C y pH 10). Las demás condiciones se trabajaron bajo los valores establecidos previamente en el grupo de investigación: concentración de sustrato de 8 g de proteína / L, relación enzima / sustrato de 0,22 (U / g de proteína), y agitación constante de 700 rpm (Gómez *et al.*, 2019). En la figura 3 se puede evidenciar el proceso de hidrolisis de las VTR con la enzima inmovilizada.

La reacción fue monitoreada por medio del grado de hidrólisis (GH), empleando el método de valoración del protón o método pH-estático.



Figura 3. Hidrólisis de vísceras de tilapia de pescado. Fuente: El autor.

Grado De Hidrólisis (GH)

La reacción se controló a través del GH, expresado como la relación entre el número de enlaces peptídicos hidrolizados (h) y el número de enlaces peptídicos totales en la proteína nativa, por unidad de peso (h_t).

El grado de hidrólisis se calculó con la ecuación (2), utilizando el método pH-stat (Forghani *et al.*, 2012).

$$GH(\%) = \frac{B N_B}{M_p a h_t} * 100(2)$$

Donde B es el volumen que será consumido de la base en L, M_p es la masa de la proteína en kg, NB es la concentración de la base y α es el grado de disociación de los grupos amino liberados durante la reacción.

Se empleó un ht de 8,2 Eq / Kg que fue calculado previamente por el método OPA (Gómez *et al.*, 2019), mientras que α y pK se calcularán con las ecuaciones. (3) y (4), respectivamente (Forghani *et al.*, 2012).

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{(1 + 10^{pH-pK})} \quad (3)$$

$$pK = 7,8 + \frac{(298 - T)}{298 \times T} \times 2400 \quad (4)$$

Fase 5: Actividad Antioxidante De Los Hidrolizados

Se realizaron dos métodos analíticos con el fin de tener más confiabilidad en los datos obtenidos:

Capacidad antirradicalaria (ABTS). Se realizó siguiendo el método descrito por Gómez y Zapata (2016), con algunas modificaciones. El radical *ABTS* fue generado por una reacción química del persulfato de potasio (2,45 mM) con el *ABTS* (7mM).

Posteriormente 20 μ L de la muestra diluida en buffer pH 7,4 o estándar Trolox, se mezclaron con 180 μ L de la solución *ABTS*⁺, y la absorbancia de la solución fue medida a 730 nm usando un lector de microplatos multimodo (Varioskan LUX, Thermo Scientific™).

Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP). Se llevó a cabo con la metodología descrita por Gómez, Figueroa y Zapata (2013), con algunas modificaciones. Se tomaron 175 μL del reactivo FRAP (con TPTZ, FeCl y buffer de acetato de sodio) recién preparado y calentado a 37 °C, se mezclaron con 25 μL de la muestra diluida en buffer o estándar Trolox, y se incubaron en la oscuridad a 37 °C por 60 minutos. Después de este tiempo se leyó la absorbancia a 595 nm usando un lector de microplatos multimodo.

Soluciones acuosas de Trolox entre 0 y 500 M se utilizaron para la calibración y los resultados se expresaron como micromoles de equivalentes Trolox por gramo de proteína ($\mu\text{molET/g}$).

Determinación del contenido de proteína de los hidrolizados. La concentración de proteína del plasma y del hidrolizado fue determinada por el método de Biuret. La curva estándar fue desarrollada usando Albumina bovina. La absorbancia fue medida a 37 °C a una longitud de onda de 540 nm.

Resultados y discusión

Fase 2: Acondicionamiento De Las Vísceras De Tilapia Roja

Caracterización de las vísceras

Los valores del contenido proximal en las vísceras de tilapia fueron determinadas por los métodos oficiales de la AOAC, la humedad por medio de secado en estufa (AOAC 950.46), cenizas por calcinación (AOAC 942.05), proteína bruta (N x 6,25) Kjeldahl (AOAC 992.15) y grasa total por (AOAC, 2006). Con el objetivo de realizar una caracterización en las vísceras. En la tabla 2 se evidencia la composición química proximal de las vísceras de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) enteras y desengrasadas.

Tabla 2. Composición proximal de las vísceras enteras y desengrasadas. Fuente: Autor.

Composición g/100g	Vísceras enteras	Vísceras desengrasadas
Humedad	62,00 ± 0,97	83,21 ± 0,05
Lípidos	26,08 ± 1,81	1,88 ± 0,04
Proteína	8,48 ± 0,25	10,04 ± 0,25
Cenizas	1,19 ± 0,04	1,71 ± 0,04

Algunas investigaciones han presentado resultados de composición proximal de vísceras enteras de diferentes especies, por ejemplo, (Šližyte, Daukšas, Falch, Storrø, & Rustadb, 2005), obtuvieron valores de humedad para vísceras de bacalao, similares a los del presente estudio, pero los valores de proteína 14,49% y cenizas 4,4% son mayores. Mientras que (Bhaskar & Mahendrakar, 2008) presentaron valores similares a este estudio, obteniendo de proteína 9,52 % y cenizas 1,47%.

En otro estudio con vísceras de tilapia como el de los autores (Riyadi, Suprayitno, Aulanni'am, & Sulistiyati, 2019) reportan la composición de las vísceras desengrasadas humedad 83,05%, proteína 5,5%, grasa 9,8% y cenizas 1,02%, se evidencia que la cantidad de humedad es similar, pero la cantidad de proteína obtenida es menor a la del presente estudio.

Se puede analizar que el tratamiento dado a las vísceras para desengrasarlas fue eficiente y logró con el objetivo dado que el porcentaje de grasa disminuyó en un 92,8%, lo cual es importante el proceso de hidrólisis enzimática de proteínas debido a que se ha reportado que la concentración de grasa tiene un efecto negativo sobre el GH de la reacción. Dicho fenómeno ha sido poco estudiado, pero algunos autores lo atribuyen a complejos proteína-lípido formados, los cuales son más resistentes a la acción catalítica de las proteasas (Gomez & Zapata, 2017).

Villamil *et al* (2017) elaboraron un comparativo de la composición de vísceras piscícolas, y concluyeron que la variabilidad en la composición depende de la especie, calidad de alimentación, edad, sexo y otros factores; pero que en general existe un particular interés en nuevas estrategias para el uso de las vísceras de pescado, por el alto contenido en proteínas y aceite con ácidos grasos omega-3 de cadena larga que pueden tener (Villamil *et al.*, 2017).

Fase 3: Actividad Catalítica De La Alcalasa 2.4L

Primero se realizó una curva patrón con la tirosina, para luego analizar los datos de la actividad catalítica de la enzima libre y la inmovilizada en UA/g de enzima.

En la tabla 3 se logra evidenciar la curva patrón de tirosina, esta permite entender la respuesta instrumental del analito (tirosina), usando la ecuación obtenida en la curva patrón, $y = 57,019x + 0,0727$.

Tabla 3. Curva patrón de tirosina a 660nm. Fuente: El autor

Cantidad de Tirosina (mg/mL)	Concentración μmol de Tirosina	Promedio Absorbancia
0,038	0,041	2,362 \pm 0,305
0,019	0,020	1,390 \pm 0,024
0,005	0,005	0,391 \pm 0,008
0,001	0,001	0,110 \pm 0,006
0,000	0	0,018 \pm 0,000

En la tabla 4, se logra evidenciar que la actividad catalítica de la enzima libre vs la inmovilizada presenta una diferencia dado que el ANOVA muestra la varianza entre la actividad catalítica de la enzima libre e inmovilizada. La razón-F, que en este caso es igual a 378,033, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro-de-grupos; puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, se puede decir concluir que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de actividad catalítica en términos de UA/g enzima.

Según Sanchez *et al* (2014) uno de los inconvenientes que pueden presentarse con la inmovilización es la pérdida de actividad enzimática. Según Sanchez *et al* (2014) reportaron que la pérdida de la actividad después del proceso de inmovilización como a la desnaturalización de proteínas, inhibición por producto intermedio o a la unión de grupos funcionales clave dentro del sitio activo lo que disminuye las interacciones con el sustrato

y la actividad. Algunos autores han reportado preparados enzimáticos que mantuvieron solo un 40% la actividad enzimática después de inmovilizar (Xu *et al.*, 2013).

Resultados similares a los obtenidos en este estudio han sido reportados por otros autores, Epor ejemplo, Silva *et al.* (2008) concluyen que en la Alcalasa inmovilizada puede conservar hasta un 73% de su actividad catalítica, mientras la enzima evaluada en este proyecto conserva un 66,8%.

Según los resultados, como ha sido ampliamente reportado, se observó una disminución de la actividad catalítica por el proceso de estabilización, debido a las restricciones conformacionales dadas por la encapsulación en la matriz de sílice y los cambios estructurales de las enzimas atrapadas en la sílice (Datta *et al.*, 2013; Escobar *et al.*, 2018). Pese a la disminución en la actividad catalítica, al ser un catalizador heterogéneo, permite su reutilización, lo que no es posible con la enzima soluble en el medio de la reacción. De acuerdo con las propiedades del biocatalizador obtenido, se puede decir que el proceso sol-gel resultó adecuado para su aplicación en el proceso de hidrolisis.

Tabla 4. Actividad catalítica de enzima libre e inmovilizada. Fuente: autor.

Muestra	Unidades (Anson/g enzima)
Enzima libre	5,693 ± 0,302
Enzima inmovilizada	3,803 ± 0,112

Al evidenciarse la pérdida de la actividad catalítica en la enzima inmovilizada respecto a la enzima libre, se optó por realizar un diseño ortogonal con el objetivo de

optimizar los recursos y conocer cuáles son los factores óptimos para realizar el ensayo en el biorreactor para hidrolisis en las vísceras de tilapia roja, por lo tanto, se tomaron como factores a analizar el pH y la temperatura. En la tabla 5, se evidencia los datos del diseño experimental para optimizar las variables de la enzima inmovilizada.

Tabla 5. Datos de diseño ortogonal con la actividad catalítica de la enzima inmovilizada para diferentes condiciones de pH y Temperatura. Fuente: el autor.

Corridas	Temperatura (°C)	pH	Actividad catalítica (UA/g enzima)
1	70	8,5	4,22
2	55	8,5	3,788
3	70	10	5,354
4	70	7	3,922
5	40	10	3,826
6	55	8,5	3,903
7	55	10	3,701
8	40	7	2,616
9	55	8,5	3,471
10	55	7	3,182
11	55	8,5	4,033
12	40	8,5	2,837
13	55	8,5	4,033

En la tabla 5 se pueden evidenciar las 13 corridas del diseño ortogonal, donde las variables modificadas fueron temperatura (40, 55 y 70°C) y pH (7, 8,5 y 10), y las variables respuesta obtenida en cada corrida, reportados como actividad catalítica en UA/g de enzima.

En la tabla 6, se presenta el análisis de varianza (ANOVA), donde se muestra la significancia estadística del modelo, de cada factor, el coeficiente de determinación R², R²-Ajustado y la carencia de ajuste.

Tabla 6. ANOVA modelo lineal. Fuente: autor

Fuente	p-valor	
Modelo	0,0001	Significativo
A-Temperatura	0,0002	
B-pH	0,0016	
Carencia de ajuste	0,2449	No significativo
R ²		0,8364
R ² Ajustado		0,8037

El ANOVA indica un modelo altamente significativo, ajustado a un modelo polinomial de primer orden (Ecuación 2), el cual describe la influencia de las variables sobre la actividad catalítica de la enzima estabilizada. Los valores de coeficiente estimado para cada factor 0,7029 y 0,5268 para temperatura y pH respectivamente, permiten evidenciar que la temperatura tiene una mayor influencia que el pH sobre la actividad catalítica de la enzima.

$$R1 (\text{Actividad catalítica}): - 1,801 + 0,046 (T) + 0,351 (pH) \quad (2)$$

En la figura 4 se evidencia la superficie de respuesta del modelo experimental, donde se muestra el efecto que tiene las variables sobre la actividad catalítica de la enzima estabilizada. Puede analizarse que no hay puntos de inflexión, es decir, que a

medida que se aumenta el pH y la temperatura aumenta la actividad catalítica en el rango evaluado.

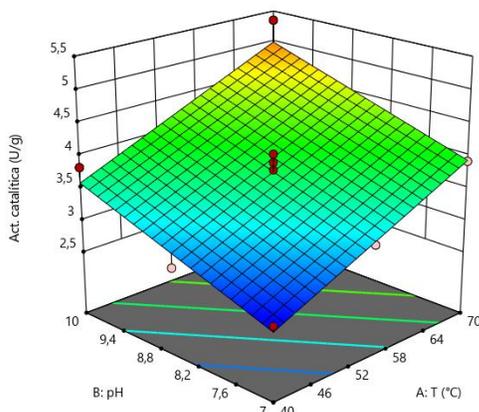


Figura 4. Diseño experimental en diagrama 3D. Fuente: Design Expert 11.

En el proceso de hidrólisis enzimática de proteínas, una mayor actividad catalítica conduce a una mayor GH, lo cual es importante porque su aumento se ha asociado con una mayor presencia de péptidos de bajo peso molecular con mayor actividad bioactiva (Liu *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2022). Por esta razón, el modelo obtenido (ecuación 2) fue sometido a un procedimiento de optimización con la metodología de superficie de respuesta, con el fin de predecir los niveles de los factores que maximizan la actividad catalítica. Las condiciones óptimas para la reacción de hidrólisis enzimática de VTR con la alcalasa 2.4L inmovilizada (ALCI) fueron: pH 10 y T 70 °C.

En el rango de estudio, los aumentos en el pH conducen a una mayor actividad catalítica de Alcalasa 2.4L. Esto fue reportado en otros estudios donde se ha demostrado que Alcalasa tiene una actividad catalítica eficiente a pH alcalino, dependiendo el valor óptimo del sustrato utilizado (Benjakul *et al.*, 2014; Chomnawang & Yongsawatdigul, 2013). Sin embargo, valores de pH muy altos pueden desnaturalizar las proteínas y dañar

algunos aminoácidos (Anal *et al.*, 2013). (Zhu *et al.*, 2022) sugieren que la enzima es un método efectivo para mejorar la tolerancia alcalina de Alcalasa, lo que facilita el uso de Alcalasa inmovilizada para aplicaciones que involucran condiciones alcalinas fuertes. Según los autores (Zapata *et al.*, 2019) los cambios en el pH afectan tanto al sustrato como a la enzima, porque cambian la distribución de cargas y la conformación de las proteínas. Además, el pH influye en la disociación de grupos activos de la enzima, afectando la dinámica de asociación de ésta con el sustrato.

De manera similar, en el rango de estudio, la temperatura afecta positivamente la actividad catalítica de Alcalasa 2.4L inmovilizada. La temperatura es una variable crítica en las reacciones enzimáticas, ya que generalmente los aumentos de temperatura conducen a aumentos en la velocidad de reacción. Aun así, debido a su naturaleza proteica, valores extremos de este factor pueden conducir a la desnaturalización y pérdida de la actividad catalítica de la enzima. Por su parte la temperatura tiene efecto sobre cualquier proceso químico o bioquímico debido a que un incremento de temperatura aumenta la energía cinética a las moléculas, pero debido a la naturaleza proteica de las enzimas su estructura terciaria se ve comprometida cuando se alcanzan elevadas temperaturas, lo que conduce a la pérdida de actividad catalítica (Pérez-Gálvez *et al.*, 2011), que se traduce en una disminución del GH cuando se trabaja por encima de un cierto límite de temperatura. Para la Alcalasa 2.4L libre otros autores han determinado temperatura óptima a 61,5 °C para hidrólisis de plasma bovino (Figuroa *et al.*, 2016), 60°C para subproductos de tilapia (Roslan *et al.*, 2015), 45°C para canalizados caracol manzana (Halim *et al.*, 2016), 60°C para vísceras de trucha (Vásquez & Zapata, 2018) y 65°C para vísceras de tilapia roja (Gómez *et al.*, 2020). Algunos autores informan que los

aumentos de temperatura por encima de 65 °C dieron como resultado una caída significativa en la estabilidad de Alcalasa libre (Glomm *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2022). Sin embargo, la temperatura óptima encontrada para la Alcalasa de 2.4L inmovilizada fue de 70 °C, lo que demuestra la eficacia del proceso de inmovilización para aumentar la estabilidad de la enzima en condiciones de operación agresivas, como lo informaron otros autores (Glomm *et al.*, 2021; Morellon- Sterling *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2022).

Para el análisis de reúso de la enzima alcalasa inmovilizada en la tabla 7 se pueden evidenciar los resultados:

Tabla 7. Análisis de reúso de la alcalasa inmovilizada. Fuente: autor

Muestra	Ensayo	Unidades (Anson/g enzima)
	1	3,803 ± 0,112
Enzima inmovilizada	2	3,057±0,026
	3	2,203±0,028

Se evidencia que después de 3 reúsos se conserva un 57% de la actividad catalítica. Otros autores, han reportado que en el caso de la celulosa inmovilizada retiene hasta un 58% de su actividad catalítica en 15 reúsos (Romo *et al.*, 2012). También en la investigación de Usuriaga (2015) se observó que hasta cinco reúsos después la enzima pierde solo 5% de su actividad catalítica. Según (Florez, 2011) por diversas razones puede perderse la actividad catalítica después de la inmovilización, como por ejemplo: la unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido, los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme

parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima, la inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva o las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima. Otro ejemplo de reusos de la alcalasa inmovilizada es la de los autores (Zhu *et al.*, 2022) conservó más de un 40% después de 5 reusos, sometiendo a la enzima a una temperatura de 85°C, adicional en este estudio se concluyó que las enzimas inmovilizadas tenían una mayor tolerancia en situaciones de alta temperatura y podían retener estabildades térmicas mucho más altas en comparación con la Alcalasa libre.

Fase 4: Proceso De Hidrólisis Enzimática De Vísceras De Tilapia Roja

En la figura 5, se evidencia la comparación del grado de hidrolisis alcanzado por las VTR usando la enzima libre vs la inmovilizada.

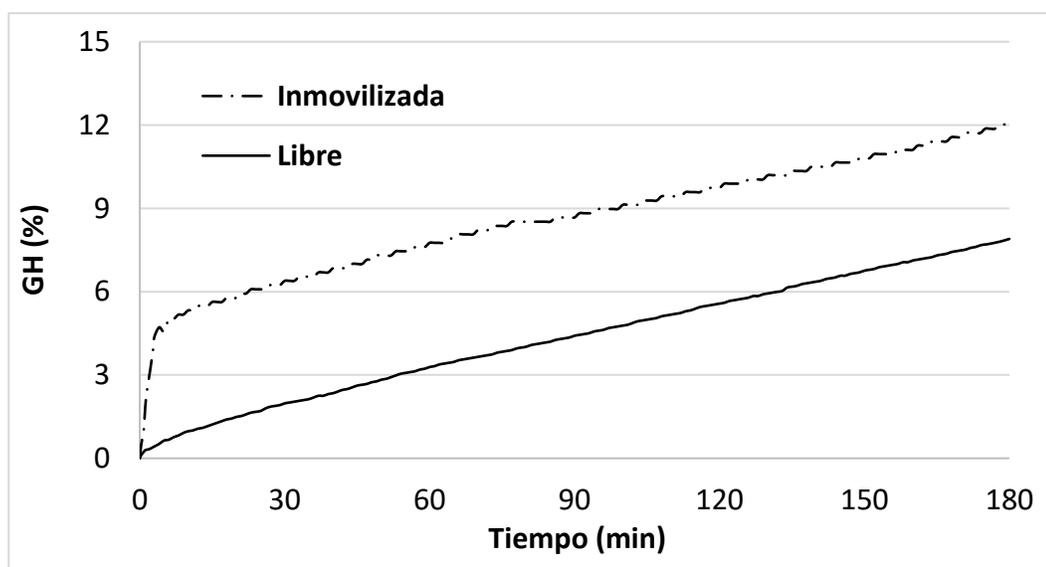


Figura 5. Grado de hidrolisis de las VTR con la reacción realizada con la enzima libre vs enzima inmovilizada. Fuente: el autor.

El proceso de hidrólisis está constituido por tres reacciones consecutivas. Primero, la formación de un complejo enzima-sustrato, luego la escisión del enlace amida que da como resultado la liberación de un péptido. Finalmente, el péptido restante se escinde de la enzima después del ataque nucleofílico por una molécula de agua. El proceso puede reiniciarse sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno solo de ellos (Benítez *et al.*, 2008).

Bajo las condiciones óptimas que arrojo el diseño experimental, se llevó a cabo el proceso de hidrólisis de las proteínas VTR con la enzima inmovilizada y libre, durante 180 minutos se compararon las dos curvas, la enzima inmovilizada obtiene un grado de hidrólisis máximo de 12,02%, donde los resultados sugieren que la enzima inmovilizada tiene mayor tolerancia a pH y temperatura elevados y podían retener estabildades mucho mayores. Esto ha sido informado previamente por otros autores que encontraron una menor inactivación de Alcalasa inmovilizada aún a altas temperaturas de incubación, en comparación con la enzima libre (Dos Santos *et al.*, 2020; Rocha *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2022). La estabilidad de Alcalasa inmovilizada podría atribuirse a una mayor rigidez de la proteína enzimática dentro del soporte y el efecto de confinamiento evita la autodigestión de la proteasa ya que las moléculas de proteasa inmovilizadas no pueden interactuar entre sí (Bernal *et al.*, 2018; Morellon-Sterling *et al.*, 2022). Además, la inmovilización protege los sitios activos del daño por altas temperaturas (Zhu *et al.*, 2022).

Es posible que en la enzima libre exponiéndose a una la temperatura de 70°C logra desestabilizar la estructura de la enzima, ocasionando una marcada disminución en su actividad catalítica. En otros estudios se ha definido que la temperatura tiene efecto sobre

cualquier proceso químico o bioquímico debido a que un incremento de temperatura aumenta la energía cinética a las moléculas, pero debido a la naturaleza proteica de las enzimas su estructura terciaria se ve comprometida cuando se alcanzan elevadas temperaturas (Zapata *et al.*, 2019). En este sentido se podría inferir que la inmovilización es un método adecuado para el uso de enzimas, específicamente la Alcalasa 2.4 L bajo condiciones de trabajo agresivas.

Por otro lado, se realizó otra hidrólisis por 360 minutos solo con la enzima inmovilizada para toma de muestra y se alcanzó un GH máximo de 18,71% en 360 minutos.

Fase 5: Actividad Antioxidante De Los Hidrolizados

La especificidad de la enzima utilizada para la proteólisis es uno de los factores más importantes para la producción de péptidos antioxidantes (Sila & Bougategf, 2016). Alcalasa 2.4L es una endopeptidasa que contiene principalmente subtilisina A de *Bacillus licheniformis*, es una proteasa reconocida para la hidrólisis de subproductos marinos y de origen animal, y se caracteriza por su eficiencia para producir hidrolizados con una alta actividad antioxidante (da Cruz *et al.*, 2020; Glomm *et al.*, 2021; Gómez *et al.*, 2019). Se evaluó la capacidad antioxidante de los hidrolizados obtenidos por Alcalasa 2.4L inmovilizado bajo las condiciones definidas en el diseño experimental, a través de dos métodos *in vitro*: uno basado en reacciones de transferencia de electrones (FRAP) y otro que puede involucrar cualquiera de los dos mecanismos transferencia de electrones o por transferencia de átomos hidrogeno (ABTS). Los resultados obtenidos se muestran en la

Tabla 8. A pesar de evaluar diferentes mecanismos, los resultados de ABTS, FRAP son consistentes y estadísticamente se encontró una correlación de Pearson con un valor de P de 0,0004 con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 8. Actividades antioxidantes de hidrolizados de VTR preparados utilizando Alcalasa 2,4 L inmovilizado con diferentes GH según lo determinado por varios ensayos.

Fuente: El autor.

GH (%)	Actividad antioxidante ($\mu\text{mol ET/g}$ de proteína)	
	ABTS	FRAP
3.0	630,33 \pm 5.69 ^a	38,58 \pm 3,28 ^a
5.8	739,77 \pm 28.21 ^b	48,04 \pm 8,09 ^b
7.8	758,81 \pm 18.92 ^b	49,06 \pm 1,87 ^b
9.7	796,27 \pm 9.59 ^c	60,6 \pm 1,05 ^c
12.0	830,48 \pm 31.26 ^d	68,58 \pm 1,93 ^d
14.6	852,82 \pm 33.85 ^{de}	78,4 \pm 5,84 ^e
16.7	877,41 \pm 19.88 ^{ef}	78,49 \pm 2,2 ^e
18.7	901,10 \pm 15.0 ^f	88,99 \pm 2,62 ^f

Para los métodos ABTS y FRAP, los resultados muestran que el proceso de hidrólisis permitió incrementar la actividad antioxidante del VTR, con una correlación entre GH y capacidad antioxidante (tabla 8), lo cual ya ha sido reportado por otros investigadores (Gómez *et al.*, 2019; Hamzeh *et al.*, 2016; Vásquez *et al.*, 2022). Esta correlación se ha atribuido a cambios estructurales en la composición, tamaño y secuencia de aminoácidos de los péptidos obtenidos, hidrofobicidad y carácter básico, y

exposición de grupos amino terminales con capacidad antioxidante (da Cruz *et al.*, 2020; Phanturat *et al.*, 2010; Sila & Bougatef, 2016). VTR muestra una alta actividad antioxidante de 901,1 y 88,99 $\mu\text{mol ET/g}$ por los métodos ABTS y FRAP respectivamente, con GH de 18,7% (tabla 8). Lo que sugiere que el hidrolizado contiene donantes de hidrógeno o electrones que pueden reaccionar con los radicales libres (Phanturat *et al.*, 2010). Esta actividad es mayor a la reportada por algunos autores para hidrolizados de proteínas con enzimas inmovilizadas. Por ejemplo, los autores Dos Santos *et al.*, 2020 encontraron una actividad máxima de 36,7 $\mu\text{M Trolox Eq}$ para la hidrólisis de gelatina de piel de tilapia obtenida por Alcalasa inmovilizada.

Por otro lado, según las investigaciones de Gómez *et al.*, 2019 la actividad antioxidante de los hidrolizados de VTR obtenidos con Alcalasa 2.4L libre a GH del 17% fue identificada como 1815,8 y 424 $\mu\text{mol ET/g}$ por los métodos ABTS y FRAP, respectivamente. Comparando los resultados entre la actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos con la enzima libre e inmovilizada, podemos notar un menor poder antioxidante en los péptidos generados por la enzima inmovilizada (Tabla 8). Esto podría deberse a alteraciones en la actividad, especificidad o selectividad de la enzima, por la interacción con el soporte o cambios en la estructura de la enzima (Rodrigues *et al.*, 2013). Estos hallazgos son contrarios a los encontrados por otros autores, quienes reportaron que la actividad antioxidante es similar para los hidrolizados obtenidos con enzima libre e inmovilizada (Dos Santos *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2022), o incluso puede ser mayor para los hidrolizados obtenidos con enzima inmovilizada (Siddiqui *et al.*, 2020). Estas diferencias se pueden atribuir a los diferentes métodos de inmovilización,

del soporte y las condiciones de inmovilización, las cuales definen las características del biocatalizador (Dos Santos *et al.*, 2020).

Conclusiones

En este estudio, la encapsulación sol-gel de Alcalasa 2.4L tuvo un rendimiento de inmovilización en términos de actividad del 67%. Los resultados muestran que las mejores condiciones de operación para la reacción de Alcalasa inmovilizada con VTR fueron 70°C y pH 10, mostrando una mejor estabilidad térmica. La Alcalasa inmovilizada fue capaz de catalizar el proceso de hidrólisis de las proteínas VTR alcanzando una GH del 18,1% tras 6 horas de reacción. El proceso sol-gel, resultó adecuado para su aplicación en la obtención de péptidos antioxidantes, encontrando hidrolizados de VTR con una actividad antioxidante de 901,1 y 88,99 $\mu\text{mol ET/g}$ por los métodos ABTS, FRAP respectivamente. Por lo tanto, se puede obtener un proceso sol-gel robusto y escalable, para facilitar el uso de Alcalasa 2.4L en la hidrólisis industrial enzimática de proteínas a partir de subproductos de pescado.

Referencias bibliográficas

- Anal, A.K., Noomhorm, A., Vongsawasdi, P., 2013. Protein hydrolysates and bioactive peptides from seafood and crustacean waste: Their extraction, bioactive properties and industrial perspectives, in: Kim, S. (Ed.), *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*. Wiley Online Library, pp. 709–735. <https://doi.org/10.1002/9781118375082>
- Baez, A., Ospina, 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*, 063 - 076.
- Balti, R., Nedjar, N., Bougatef, A., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Three novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) using digestive proteases. *Food Research internacional*, 1136 - 1143.
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica Clínica Latinoamericana*, 227 - 236.
- Benjakul, S., Yarnpakdee, S., Senphan, T., Halldorsdottir, S.M., Kristinsson, H.G., 2014. Fish protein hydrolysates: production, bioactivities, and applications, in: Kristinsson, H.G. (Ed.), *Antioxidants and Functional Components in Aquatic Foods*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 238–283. <https://doi.org/10.1002/9781118855102>
- Bernal, C., Lopez, B., & Mesa, M. (2007). Inmovilización de lactasa en sílicas con porosidad controlada. *Scientia Et Technica*, 103-106.
- Bhaskar, N., & Mahendrakar, N. (2008). Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*): Optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease. *Bioresource Technol*, 99(10), 4105-4111.
- Caetano-Silva, M.E., Cilla, A., Bertoldo-Pacheco, M.T., Netto, F.M., Alegría, A., 2018. Evaluation of in vitro iron bioavailability in free form and as whey peptide-iron complexes. *J. Food Compos. Anal.* 68, 95–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.03.010>
- Calamaya, M., Yu, W., & Wu, J. (2018). Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food chem*, 205 - 222.
- Carocho, M., & Ferreira, I. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical toxicology*, 15 - 22.

- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 107 - 120.
- Carteret, C., Blin, J., Geraldin, C., Rodehüser, L., Selve, C., & Stébé, M. (2005). Direct One-Step Immobilization of Glucose Oxidase in Well-Ordered Mesostructured Silica Using a Nonionic Fluorinated Surfactant. *American Chemical Society*, 1479 - 1486.
- Cheung, I.W.Y., Cheung, L.K.Y., Tan, N.Y., Li-Chan, E.C.Y., 2012. The role of molecular size in antioxidant activity of peptide fractions from Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates. *Food Chem.* 134, 1297–1306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.215>
- Cherry, J., & Fidantsef, A. (2003). Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol*, 438 - 443.
- Chomnawang, C., Yongsawatdigul, J., 2013. Protein Recovery of Tilapia Frame By-Products by pH-Shift Method. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 22, 112–120. <https://doi.org/10.1080/10498850.2011.629077>
- Cian, R., Drago, S., & González, R. (2011). Propiedades antioxidantes e inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ECA I) de fracciones ultrafiltradas de hidrolizados de hemoglobina bovina . *REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUA*.
- Copeland, R. (2000). *Enzimas : una introducción práctica a la estructura, el mecanismo y el análisis de datos*. Obtenido de Wiley Online library: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0471220639>
- Da Cruz, C.Z.P., de Mendonça, R.J., Guimaraes, L.H.S., dos Santos Ramos, M.A., Garrido, S.S., de Paula, A.V., Monti, R., Massolini, G., 2020. Assessment of the Bioactive Potential of Cheese Whey Protein Hydrolysates Using Immobilized Alcalase. *Food Bioprocess Technol.* 13, 2120–2130. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02552-4>
- Datta, S., Christena, L.R., Rajaram, Y.R.S., 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* 3, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
- Dos Santos, K., Mellinger- Silva, C., Santa Brígida, A.I., Rocha Barros, L., 2020. Modifying alcalase activity and stability by immobilization onto chitosan aiming at the production of bioactive peptides by hydrolysis of tilapia skin gelatin. *Process Biochem.* 97, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.019>
- Doucet, D., Otter, D., Gauthier, S., & Foegeding, A. (2003). Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. *J Agric Food chem*, 6300 - 6308.

- Escobar, S., Bernal, C., Bolivar, J., Nidetzky, B., Lopez, F., & Mesa, M. (2018). Understanding the silica based sol-gel encapsulation mechanism of *Thermomyces lanuginosus* lipase: The role of polyethylenimine. *Molecular catalysis*, 406 - 449.
- Escobar, S., Bernal, C., Mesa, M., 2015. Relationship between sol-gel conditions and enzyme stability: a case study with β -galactosidase/silica biocatalyst for whey hydrolysis. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 26, 1126–1138. <https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1078929>
- Figuerola, O., Peñaloza, S., Mejia, E., & Zapata, J. (2020). Efecto de la relación enzima-sustrato en la hidrólisis enzimática de lactosuero bovino por Alcalasa® 2.4L. *Información tecnológica*, 03 - 12.
- Florez, G. 2011. Efecto De Un Proceso De Inmovilización Por Gelación Iónica Sobre La Actividad Proteolítica De Mexicaína. Instituto politecnico nacional.
- Forghani, B., Ebrahimpour, A., Bakar, J., Hamid, A., Hassan, Z., & Saari, M. (2012). Enzyme Hydrolysates from *Stichopus horrens* as a New Source for Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Peptides. *Hindawi*.
- Fullana, N. (2014). *Producción y caracterización parcial de una proteasa bacteriana activa a baja temperatura*. Uruguay : Tesis de grado .
- Galazzi, E., Gallo, A., & Torres, M. (2018). Obtención de hidrolizados y péptidos con actividad antioxidante a partir de proteínas de chía (*Salvia hispanica* L). *UNNOBA* .
- Gianfranceschi, G., Gianfranceschi, G., Quassinti, L., & Bramucci, M. (2018). Biochemical requirements of bioactive peptides for nutraceutical efficacy. *Journal of Functional Foods*, 252 - 263.
- Glomm, W.R., Wubshet, S.G., Lindberg, D., Dankel, K.R., Afseth, N.K., Stenstad, P.M., Johnsen, H., 2021. Immobilized protease on magnetic particles for enzymatic protein hydrolysis of poultry by-products. *LWT - Food Sci. Technol.* 152, 112327. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112327>
- Gomez, L., & Zapata, J. (2017). Efecto del Nivel de Grasa y Velocidad de Agitación en la Hidrólisis Enzimática de Vísceras de Tilapia Roja (*Oreochromis* sp.). *Información tecnológica*, 28 (4).
- Gómez, L., Gómez, N., Zapata, J., López, G., Cilla, A., & alegría, A. (2019). In-vitro antioxidant capacity and cytoprotective/cytotoxic effects upon Caco-2 cells of red tilapia (*Oreochromis* spp.) viscera hydrolysates. *Food Research International*, 52 - 61.
- Gupta, R., & Chaudhury, N. (2007). Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: problems and future prospects. *Biosens bioelectron*, 2387 - 2399.

- Halim, N., Yusof, H., & Sarbon, N. (2016). Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science and Technology*, 24 - 33.
- Hamzeh, A., Benjakul, S., & Senphan, T. (2016). Comparative study on antioxidant activity of hydrolysates from splendid squid (*Loligo formosana*) gelatin and protein isolate prepared using protease from hepatopancreas gelatin and protein isolate prepared using protease from hepatopancreas. *Journal of Food Science and Technology -Mysore*.
- Hwang, E., & Gu, M. (2013). Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. *Eng. Life Sci*, 49 - 61.
- Je, Y., Park, S., Ahn, C., & Hwang, J. (2015). Amino acid composition and in vitro antioxidant and cytoprotective activity of abalone viscera hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 94 - 103.
- Kim, J., Jia, H., Woo – Lee, C., Wook – Chung, S., Kwak, J., Shin, Y., . . . Grate, J. (2006). Single enzyme nanoparticles in nanoporous silica: A hierarchical approach to enzyme stabilization and immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*, 474 - 480.
- Kirk, O., & Fuglsang, C. (2002). Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol*, 345 - 351.
- Lee, S., Doan, T., Ha, S., Jin – Chang, W., & Mo – Koo, Y. (2007). Influence of ionic liquids as additives on sol–gel immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 129 - 134.
- Li, Y., Clark, K.A., Tan, Z., 2018. Methods for engineering therapeutic peptides. *Chinese Chem. Lett.* 29, 1074–1078. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2018.05.027>
- Liu, Y., Li, X., Chen, Z., Yu, J., Wang, F., Wang, J., 2014. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. *Food Chem.* 151, 459–465. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.089>
- Lupano, C. (2013). *Modificaciones de componentes de los alimentos: cambios químicos y bioquímicos por procesamiento y almacenamiento*. Buenos aires: Tesis de grado.
- Meneau, R., Borrego, K., Garrido, M., & Fariñas, T. (2020). Inmovilización una mirada a los métodos, soportes y desafíos. *CENIC Ciencias Biológicas*, 59 - 78.
- Meneau, R., Borrego, K., Garrido, M., & Fariñas, T. (2020). Inmovilización una mirada a los métodos, soportes y retos. *Revista CENIC Ciencias Biologicas*, 059 - 078.

- Minagricultura. (2020). *Cadena de acuicultura*. Obtenido de <https://sioc.minagricultura.gov.co/Acuicultura/Documentos/2020-12-30%20Cifras%20Sectoriales.pdf>
- Morales, J.A., Figueroa, O.A., Zapata, J.E., 2017. Optimización de hidrólisis enzimática de la fracción globular de sangre bovina por metodología de superficie respuesta y evaluación de sus propiedades antioxidantes. *Inf. tecnológica*. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000200009>
- Morellon-Sterling, R., Tavano, O., Bolivar, J.M., Berenguer-Murcia, Á., Vela-Gutiérrez, G., Sabir, J.S.M., Tacias-Pascacio, V.G., Fernandez-Lafuente, R., 2022. A review on the immobilization of pepsin: A Lys-poor enzyme that is unstable at alkaline pH values. *Int. J. Biol. Macromol.* 210, 682–702. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.224>
- Mukherjee, A., & Rai, H. (2008). Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal*, 353 - 361.
- Najafian, L., & Babji, A. (2014). Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. *Journal of Functional foods*, 280 - 289.
- Nelms, J., Edwards, R., Warwick, J., & Fotheringham, Y. (1992). Novel mutations in the pheA gene of *Escherichia coli* K-12 which result in highly feedback inhibition-resistant variants of chorismate mutase/prephenate dehydratase. *Appl Environ Microbiol*, 2592 – 2598.
- Nichele, V., Signoretto, M., & Ghedini, E. (2011). β -Galactosidase entrapment in silica gel matrices for a more effective treatment of lactose intolerance. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10 - 15.
- OCDE. (2016). *Pesca y acuicultura en Colombia*. Obtenido de https://www.oecd.org/colombia/Fisheries_Colombia_SPA_rev.pdf
- Oliveira, J.P.B., Gonçalves, L.R.B., Amorim, K.P.S., Pinheiro, B.B., Ramos, M. V., Souza, P.F.N., Oliveira, J.S., Freitas, D.C., Freitas, C.D.T., 2022. Immobilization and characterization of latex cysteine peptidases on different supports and application for cow's milk protein hydrolysis. *Process Biochem.* 117, 180–190. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.04.005>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem*, 4619-4626.

- Phanturat, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S., 2010. Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 43, 86–97.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.010>
- Pérez-Gálvez, R., Almécija, C., Espejo, J., M, E., & Guadix, A. (2011). Bi-Objective Optimisation of the Enzymatic Hydrolysis of Porcine Blood Protein,. *Biochem Eng J*, 53(3), 305–10.
- Perry, F., & Hegeman, A. (2007). Enzymatic reaction mechanisms. *Bambed*, 244 - 248.
- Pierre, A.C., 2004. The sol-gel encapsulation of enzymes. *Biocatal. Biotransformation* 22, 145–170. <https://doi.org/10.1080/10242420412331283314>
- Pinzón, L., Sánchez, M. J., & Hernández, H. (2016). Aprovechamiento de las vísceras de pescado como fuente de energía para minimizar el problema de contaminación ambiental del sector piscícola. *Universidad del Tolima*.
- Riyadi, P., Suprayitno, E., Aulanni'am, A., & Sulistiyati, T. (2019). Chemical Characteristics and Amino Acids Profile of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Viscera. *World's Veterinary Journal*, 9(4), 324-328.
- Rocha, G.F., Kise, F., Rosso, A.M., Parisi, M.G., 2017. Potential antioxidant peptides produced from whey hydrolysis with an immobilized aspartic protease from *Salpichroa origanifolia* fruits. *Food Chem.* 237, 350–355.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.112>
- Romo, S., Camacho, C., Gómez, L., Villalonga, R., Úbeda, J., Arevalo, M., . . . Ramírez, H. (2012). INMOVILIZACIÓN DE CELULASA SOBRE UNA MATRIZ DE QUITINA-QUITOSANA. *Revista Cubana de Química*, 57-64.
- Rodrigues, R.C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Fernández-Lafuente, R., 2013. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem. Soc. Rev.* 42, 6290–6307. <https://doi.org/10.1039/C2CS35231A>
- Roslan, J., Mustapal, S.M., Yunos, K.F., Abdullah, N., 2015. Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product using response surface methodology. *Int. Food Res. J.* 22, 1117–1123.
- Saavedra, M. (2016). *Hidrólisis enzimática de proteína de residuo de merluza a alta concentración de sólidos sin control de ph*. Tesis de grado.
- Salazar, C., López, A., & Cano, J. (2012). Efecto del pH y la temperatura en la hidrólisis enzimática de subproductos de la industria bovina. *Revista Lasallista de Investigación*, 9 (2).

- Samaranayaka, A., & Li-Chan, E. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 229 - 250.
- Sanchez, J., Contreras, J., Martinez, J., Medina, M., Segura, E., & Aguilar, C. (2014). Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas. *Quím. Nova*.
- Sarmadi, B., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Elsevier*, 1949 - 1956.
- Siddiqui, I., Husain, Q., Azam, A., 2020. Exploring the antioxidant effects of peptides from almond proteins using PANi-Ag-GONC conjugated trypsin by improving enzyme stability & applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 158, 150–158.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.188>
- Sila, A., & Bougatef, A. (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods*, 10 - 26.
- Silva, V., Contesini, F., & Carvalho, P. (2008). Characterization and catalytic activity of free and immobilized lipase from *Aspergillus niger*: a comparative study. *Braz. Chem. Soc.*
- Šližyte, R., Daukšas, E., Falch, E., Storrø, I., & Rustadb, T. (2005). Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, 40(6), 2021-2023.
- Sun, N., Cui, P., Jin, Z., Wu, H., Wang, Y., Lin, S., 2017. Contributions of molecular size, charge distribution, and specific amino acids to the iron-binding capacity of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) ovum hydrolysates. *Food Chem.* 230, 627–636.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.077>
- Sundblom, A., Oliveira, C., Pedersen, J., & Palmqvist, A. (2010). On the Formation Mechanism of Pluronic-Templated Mesoporous Silica. *American Chemical Society*, 3483 – 3492.
- Suwal, S., Ketnawa, S., Liceaga, A., & Huang, J. (2018). Electro-membrane fractionation of antioxidant peptides from protein hydrolysates of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) byproducts. *Innovative Food Science & emerging technologies*.
- Suwal, S., Ketnawa, S., Liceaga, A., & Huang, J. (2018). Electro-membrane fractionation of antioxidant peptides from protein hydrolysates of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) byproducts. *Innovative Food Science & emerging technologies*.
- Tavano, O. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1 -11.

- Tejada, E., Fernandez, Y., & Salazar, M. (2020). Actividad antioxidante y antimicrobiana del hidrolizado de gelatina de pieles de *Sarda chiliensis chiliensis* "bonito". *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 207 - 2018.
- Thu, T., & Krasaekoopt, W. (2016). Encapsulation of protease from *Aspergillus oryzae* and lipase from *Thermomyces lanuginosus* using alginate and different copolymer types. *Agriculture and Natural Resources*, 155-161.
- Torres, N., & Granda, I. (2017). Estimación de los desperdicios generados por la producción de trucha arcoíris en el lago de Tota, Colombia. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*, 245 - 255.
- Umayaparvathi, S., Muthuvel, A., Saravanan, M., & Vinayagam, V. (2014). Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine and preventive nutrition*.
- Van der Hoorn, R. (2008). Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 191 - 223.
- Vaseva, I., Sabotic, J., Sustar-Vozlic, J., Meglic, V., Kidric, M., Demirevska, K., & Simova-Stoilova, L. (2012). The response of plants to drought stress: the role of dehydrins, chaperones, proteases and protease inhibitors in maintaining cellular protein function. In: *Droughts: New Research. Neves DF and Sanz JD.*, 1 - 45.
- Vasquez, P., Zapata, J.E., 2018. Optimization of enzymatic hydrolysis of viscera proteins of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Adv. J. Food Sci. Technol.* 16, 292–300.
<https://doi.org/10.19026/ajfst.16.5970>
- Vásquez, P., Zapata, J.E., Chamorro, V.C., García Fillería, S.F., Tironi, V.A., 2022. Antioxidant and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera hydrolysates subjected to simulated gastrointestinal digestion and intestinal absorption. *LWT* 154, 112834.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112834>
- Villamil, O., Váquiro, H., & Solanilla, J. (2017). Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. *Food Chemistry*, 160 -171.
- Wei, Y., Xu, J., Feng, Q., Dong, H., & Lin, M. (2000). Encapsulation of enzymes in mesoporous host materials via the nonsurfactant-templated sol-gel process. *Materials Letters*, 6 -11.
- Witoon, T., Tepsarn, S., Kittiponkin, P., Embely, B., & Chareonpanich, M. (2011). Effect of pH and chitosan concentration on precipitation and morphology of hierarchical porous silica. *Journal of Non-Crystalline solids*, 3515 - 3519.

- Wu, R., Wu, C., Liu, D., Yang, X., Huang, J., Zhang, J., . . . He, H. (2018). Antioxidant and anti-freezing peptides from salmon collagen hydrolysate prepared by bacterial extracellular protease. *Food chemistry*, 346 - 352.
- Xu, J., Sun, H., He, X., & Bai, Z. (2013). Highly efficient synthesis of endomorphin-2 under thermodynamic control catalyzed by organic solvent stable proteases with in situ product removal. *proteases with in situ product removal*, 663 - 666.
- Zapata, J., & Gutiérrez, C. (2017). Hidrolizados de pescado: producción, beneficios y nuevos avances en la industria. Una revisión. *Agroindustria y Ciencia de los Alimentos*, 311 - 322.
- Zapata, J., Moya, M., & Figueroa, O. (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. *Informacion tecnologica*, 30(6), 63-72.
- Zhang, B., Li, P., Zhang, H., Wang, H., Li, X., Tian, L., Ali, N., Ali, Z., Zhang, Q., 2016. Preparation of lipase/Zn₃(PO₄)₂ hybrid nanoflower and its catalytic performance as an immobilized enzyme. *Chem. Eng. J.* 291, 287–297.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.01.104>
- Zhu, H., Zhang, Y., Yang, T., Zheng, D., Liu, X., Zhang, J., Zheng, M., 2022. Preparation of immobilized Alcalase based on metal affinity for efficient production of bioactive peptides. *LWT - Food Sci. Technol.* 162, 113505. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113505>