

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**EVALUACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN Y
FRACCIONAMIENTO DE PROTEÍNAS MEDIANTE LA APLICACIÓN DE
TECNOLOGÍAS DE MEMBRANAS, A PARTIR DE UN SUBPRODUCTO
OBTENIDO DEL PROCESAMIENTO INDUSTRIAL DE PESCADO**

**Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de
Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos para optar al grado
y título de Maestría Académica en Ciencia de Alimentos**

MANUEL MONTERO BARRANTES

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2018

DEDICATORIA

A Dios por haberme permitido llegar hasta aquí, por darme salud y llenar mi vida de amor.

A Carla por haberme apoyado en todo momento, por motivarme y enseñarme a amar.

A Javier, mi inyección de motivación en la recta final.

A mis padres, mi ejemplo, mis maestros, por su amor incondicional, soy lo que soy gracias a ustedes.

“La familia es la brújula que nos guía. Es la inspiración para llegar a grandes alturas, y nuestro consuelo cuando ocasionalmente fallamos”.

Brad Henry

AGRADECIMIENTOS

A mi equipo asesor: Óscar Acosta, por su apoyo, dedicación y colaboración en el desarrollo del proyecto, en especial en los últimos 2 meses con recargo incluido; Marvin Soto, por sus aportes en el planteamiento, el análisis estadístico y la revisión “internacional”; y María Lourdes Pineda, por su revisión meticulosa y por aportar observaciones valiosas para la mejora del trabajo.

Al proyecto “Recuperación de fracciones proteicas funcionales del licor de pescado obtenido en el proceso de producción de harinas de pescado” (735-B6-603), con apoyo del Fondo Especial de Estímulo a la Investigación de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), al Programa de Posgrado de Ciencia de Alimentos, a la Escuela de Tecnología de Alimentos, al Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot) y al Instituto Clodomiro Picado por hacer posible este trabajo.

A Marvin Quesada y a Tunatun S.A. por su disposición y por el aporte de la materia prima de este proyecto.

A Lorenzo Pastrana por compartir sus ideas; a Bruno Lomonte y Jorge Araya Matthey por su invaluable colaboración en la puesta a punto y la implementación de los principales análisis de este trabajo.

A Rafael Picado y Juan Carlos Delgado por su esfuerzo, compromiso y apoyo en las actividades de planta y análisis. A Juan Carlos Cordero por acondicionar el anexo de planta piloto; a Giovanni González y Luis Morales por su apoyo en el laboratorio.

A todo el personal de la Escuela de Tecnología de Alimentos y del CITA que de manera directa o indirecta hicieron posible el desarrollo de este trabajo.

A Carla y Javi por todo.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencia de Alimentos de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencia de Alimentos.”

Ph.D. Ana Mercedes Pérez Carvajal
Representante del Decano
Sistema de Estudios de Posgrado

Ph. D. Óscar Acosta Montoya
Director de Tesis

M.Sc. Marvin Soto Retana
Asesor

M.Sc. María Lourdes Pineda Castro
Asesora

M.Sc. Alejandro Chacón Villalobos
Representante de la Directora
Programa de Posgrado en Ciencia de Alimentos

Manuel Montero Barrantes
Candidato

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDOS	v
RESUMEN	x
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
I. JUSTIFICACIÓN	1
II. OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo general	5
2.2 Objetivos específicos	5
III. MARCO TEÓRICO	6
3.1 La industria pesquera y sus subproductos	6
3.2 Valorización de subproductos de la industria pesquera	9
<i>3.2.1. Para la explotación en masa</i>	10
<i>3.2.2. Para la explotación en pequeño volumen</i>	11
3.3 Gelatina de pescado	12
<i>3.3.1 Elaboración</i>	14
3.3.1.1 Pretratamiento	15
3.3.1.2 Extracción	17
<i>3.3.2 Propiedades funcionales</i>	20
3.3.2.1 Propiedades gelificantes	21
3.3.2.1.1 Fuerza de gel	22
3.3.2.1.2 Temperaturas de gelificación y fusión	23
3.3.2.1.2.1 Pruebas oscilatorias	23
3.3.2.2 Propiedades de superficie	26
3.3.2.2.1 Capacidad emulsificante	26
3.3.2.2.2 Capacidad espumante	28

3.4 Tecnologías de membrana	29
3.4.1 <i>Tipos de tecnología de membrana</i>	30
3.4.1.1 Ósmosis inversa.....	31
3.4.1.2 Nanofiltración	32
3.4.1.3 Ultrafiltración	32
3.4.1.4 Microfiltración.....	33
3.4.2 <i>Factores que afectan la eficiencia y productividad de las tecnologías de membrana</i>	34
3.4.2.1 Punto de corte o diámetro del poro	35
3.4.2.2 Velocidad tangencial	36
3.4.2.3 Temperatura	37
3.4.2.4 Presión transmembranaria	37
3.5 Recuperación de compuestos proteicos utilizando tecnologías de membrana	37
3.5.1 <i>Pretratamientos</i>	39
3.5.2 <i>Hidrólisis enzimática</i>	40
3.5.3 <i>Recuperación</i>	42
3.5.4 <i>Fraccionamiento y concentración</i>	43
3.5.5 <i>Purificación</i>	45
3.5.6 <i>Secado</i>	45
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	47
4.1 Localización del proyecto	47
4.2 Materia prima	47
4.2.1 <i>Tamaño de lote y condiciones de almacenamiento</i>	48
4.2.2 <i>Caracterización química</i>	49
4.3 Metodología	49
4.3.1 <i>Optimización del pretratamiento ácido de la piel de atún y de la etapa de extracción, a escala de laboratorio, para obtener el licor de pescado.</i>	49
4.3.1.1 Optimización del pretratamiento ácido.....	50
4.3.1.1.1 Diseño experimental	50
4.3.1.1.2 Procedimiento	52
4.3.1.1.3 Análisis estadístico.....	53
4.3.1.1.4 Verificación del modelo	53

4.3.1.2 Optimización de la etapa de extracción	54
4.3.1.2.1 Diseño experimental	54
4.3.1.2.2 Procedimiento	55
4.3.1.2.3 Análisis estadístico	56
4.3.1.2.4 Verificación del modelo	57
4.3.2 Escalamiento, a nivel piloto, del proceso de extracción de proteínas para obtener el licor de pescado en mayor volumen.....	57
4.3.2.1 Diseño experimental	57
4.3.2.2 Procedimiento	58
4.3.2.2.1 Escala de laboratorio.....	58
4.3.2.2.2 Escala de planta piloto	59
4.3.2.3 Análisis estadístico	60
4.3.3 Evaluación de diferentes tecnologías de membrana para el fraccionamiento de las proteínas extraídas del licor de pescado.	61
4.3.3.1 Tratamiento enzimático del licor de pescado	61
4.3.3.1.1 Diseño experimental	61
4.3.3.1.2 Procedimiento	62
4.3.3.1.3 Análisis estadístico	63
4.3.3.2 Fraccionamiento de las proteínas del licor de pescado	63
4.3.3.2.1 Diseño experimental	64
4.3.3.2.2 Procedimiento	65
4.3.3.2.3 Análisis estadístico	67
4.4 Análisis físico-químicos	68
4.4.1 Determinación de pH.....	68
4.4.2 Determinación de humedad	68
4.4.3 Determinación de proteína	68
4.4.4 Determinación de grasa	68
4.4.5 Determinación de cenizas	68
4.4.6 Determinación de la fuerza del gel	68
4.4.7 Determinación del porcentaje de hidratación de la piel y del rendimiento de las etapas de proceso de la extracción del licor de pescado.....	69

4.4.8	<i>Determinación de la distribución de tamaño de las proteínas</i>	69
4.4.9	<i>Evaluación del comportamiento viscoelástico por pruebas de oscilación para la determinación de las temperaturas de gelificación y fusión</i>	70
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
5.1	Caracterización química de la materia prima	71
5.2	Optimización del pretratamiento ácido de la piel de atún y de la etapa de extracción, a escala de laboratorio, para obtener el licor de pescado.	72
5.2.1	<i>Optimización del pretratamiento ácido</i>	72
5.2.1.1	Hidratación de la piel y masa de licor de pescado	75
5.2.1.2	Fuerza y pH del gel	77
5.2.1.3	Optimización y verificación de los modelos generados	81
5.2.2	<i>Optimización de la etapa de extracción</i>	82
5.2.2.1	Temperaturas de gelificación y fusión y fuerza de gel	84
5.2.2.2	Optimización y verificación de los modelos generados	89
5.3	Escalamiento, a nivel piloto, del proceso de extracción de proteínas para obtener el licor de pescado que se procesará con las membranas	92
5.3.1	<i>Comparación de los rendimientos de las diferentes etapas y de la composición de las salidas del proceso de extracción de licor de pescado.</i>	92
5.3.2	<i>Comparación de las propiedades de gelificación de las gelatinas obtenidas.</i>	95
5.4	Evaluación de diferentes tecnologías de membrana para el fraccionamiento de proteínas extraídas del licor de pescado	97
5.4.1	<i>Tratamiento enzimático del licor de pescado</i>	98
5.4.2	<i>Fraccionamiento de las proteínas del licor de pescado</i>	102
5.4.2.1	Fraccionamiento con la membrana de 0,8 μm	102
5.4.2.2	Fraccionamiento con la membrana de 100 nm.....	105
5.4.2.3	Fraccionamiento con la membrana de 50 nm.....	107
5.4.2.4	Fraccionamiento con la membrana de 20 nm.....	110
5.4.2.5	Fraccionamiento del licor de pescado utilizando 4 membranas en serie.....	113
VI.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	116
6.1	Conclusiones	116
6.2	Recomendaciones	117
VII.	REFERENCIAS	119

VIII. ANEXOS.....	136
8.1 Ficha técnica de la enzima utilizada	136
8.2 Condiciones de operación del liofilizador	138
8.3 Procedimiento de limpieza del equipo de MF-UF	139

RESUMEN

La industria pesquera genera subproductos con compuestos valiosos que son desaprovechados. En esta investigación se optimizó la extracción de gelatinas y se evaluó su fraccionamiento, mediante tecnologías de membrana, para obtener fracciones con capacidades gelificante diferenciadas.

Se optimizaron, a escala de laboratorio, el pretratamiento ácido (la concentración de ácido acético y el tiempo) y la extracción (tiempo y temperatura) utilizando la metodología de superficie de respuesta. El proceso de extracción optimizado se escaló 80 veces a nivel de planta piloto. Se definió un tratamiento enzimático para ampliar el rango de tamaño de las proteínas en el licor de pescado y posteriormente se fraccionó utilizando 4 membranas en serie (0,8 μm , 100 nm, 50 nm y 20 nm), evaluando el efecto individual de cada membrana y el efecto del proceso general sobre la capacidad gelificante de las proteínas.

Para el pretratamiento ácido se obtuvo una concentración óptima de ácido acético de 0,225 M para maximizar la hidratación de la piel. En la etapa de extracción se determinó que el tiempo y la temperatura afectan las propiedades de gelificación de las proteínas presentes en el licor, obteniendo valores óptimos de 0,38 h y 54 °C para maximizar las temperaturas de fusión y gelificación. Se logró escalar el proceso de extracción a nivel de planta piloto obteniendo un licor que no difiere significativamente ($p > 0,05$) en su composición, su fuerza de gel y su temperatura de fusión respecto al obtenido a nivel de laboratorio. Con la aplicación del tratamiento enzimático (subtilisina) (38 μL de preparado/kg de licor, 20 min y 60 °C) se logró ampliar el diferencial de tamaños de las proteínas del licor de pescado de 2,9 a 8,3. Las filtraciones con membranas cerámicas de 0,8 μm , 100 nm, 50 nm y 20 nm presentaron flujos de permeado de $1274 \pm 64 \text{ kg/hm}^2$, $122 \pm 24 \text{ kg/hm}^2$, $93 \pm 14 \text{ kg/hm}^2$ y $29 \pm 12 \text{ kg/hm}^2$ a valores de FRV máximos de 8,25, 7,5, 6,0 y 3,25, respectivamente. Las membranas de 100 nm, 50 nm y 20 nm, generaron retenidos y permeados con propiedades de gelificación significativamente diferentes. Respecto al proceso en serie, el permeado de 20 nm presentó las menores propiedades de gelificación, ya que las proteínas con pesos moleculares mayores a 75 kDa fueron retenidas totalmente.

Los resultados de la investigación muestran la factibilidad técnica para la obtención y el fraccionamiento, utilizando tecnología de membranas, de proteínas con capacidades gelificantes a partir de la piel de atún, las cuales podrían utilizarse como ingredientes funcionales en diferentes industrias.

Palabras clave: industria pesquera, valorización de subproductos, ingredientes funcionales, ultrafiltración, propiedades de gelificación, gelatina de pescado.

LISTA DE CUADROS

Cuadro I. Producción y utilización de la pesca y la acuicultura en el mundo.	7
Cuadro II. Subproductos del proceso de pescado y sus compuestos valiosos	8
Cuadro III. Condiciones de proceso empleadas en el pretratamiento con ácido utilizado en la extracción de gelatina de subproductos de la industria pesquera.	16
Cuadro IV. Condiciones de proceso empleadas para extraer gelatina de subproductos de la industria pesquera.	19
Cuadro V. Características generales de diferentes configuraciones de membrana.....	30
Cuadro VI. Enzimas y condiciones de proceso para la hidrólisis de diferentes subproductos de la industria pesquera.....	41
Cuadro VII. Condiciones de centrifugación para la recuperación de hidrolizados de subproductos de la industria pesquera	43
Cuadro VIII. Punto de corte de membranas de UF para el fraccionamiento de hidrolizados de proteínas de origen marino.	44
Cuadro IX. Variables independientes y los niveles empleados en el diseño central compuesto rotable para optimizar el pretratamiento ácido.	51
Cuadro X. Ensayos realizados (orden aleatorio) para optimizar el pretratamiento ácido.	51
Cuadro XI. Variables independientes y los niveles empleados en el diseño central compuesto rotable para optimizar el tratamiento de extracción.	54
Cuadro XII. Ensayos realizados (orden aleatorio) en la optimización del tiempo y de la temperatura de extracción de proteínas.	54
Cuadro XIII. Variables independientes y los niveles empleados en el diseño central compuesto rotable para optimizar el tratamiento enzimático del licor de pescado.	61
Cuadro XIV. Ensayos realizados (orden aleatorio) en la optimización del tiempo y de la concentración de enzima del tratamiento enzimático.	62
Cuadro XV. Punto de corte de las membranas a utilizar en el fraccionamiento de las proteínas del licor de pescado.	64
Cuadro XVI. Diseño experimental para la evaluación de la filtración de cada membrana sobre el fraccionamiento de las proteínas del licor de pescado.....	65
Cuadro XVII. Diseño experimental para la evaluación del efecto del proceso de fraccionamiento por membranas sobre las características de las diferentes fracciones.....	66
Cuadro XVIII. Composición química de la piel de atún obtenida del proceso de producción de lomos de atún fresco, utilizada para la extracción del licor de pescado.	71

Cuadro XIX. Efecto de la concentración de ácido acético y el tiempo del pretratamiento ácido, sobre diferentes características del proceso de extracción del licor de pescado.	73
Cuadro XX. Efecto de la concentración de ácido acético y el tiempo del pretratamiento ácido, a temperatura ambiente, sobre diferentes características evaluadas a un gel elaborado con las proteínas extraídas.	73
Cuadro XXI. Resultados de los análisis de evaluación de los modelos de optimización del pretratamiento ácido generados para las diferentes variables respuesta.	74
Cuadro XXII. Valores de las variables respuesta predichas y obtenidas para las condiciones óptimas de la etapa del pretratamiento ácido en la extracción del licor de pescado a nivel de laboratorio ¹ y el porcentaje de error obtenido.	82
Cuadro XXIII. Efecto de la temperatura y del tiempo de la etapa de extracción sobre el rendimiento de extracción de proteínas y diferentes características evaluadas a un gel elaborado con estas proteínas (6,67% m/v).	83
Cuadro XXIV. Resultados de los análisis de evaluación de los modelos de optimización de la etapa de extracción generados para las diferentes variables respuesta.....	84
Cuadro XXV. Valores de las variables respuesta predichas y obtenidas para las condiciones óptimas de la etapa del pretratamiento ácido en la extracción del licor de pescado a nivel de laboratorio ¹ y el porcentaje de error obtenido.	91
Cuadro XXVI. Rendimientos de cada etapa del proceso de extracción de licor de pescado según la escala aplicada.....	93
Cuadro XXVII. Contenido de humedad, proteína, grasa, ceniza y pH de la piel de atún, el licor de pescado y los subproductos del proceso de extracción de licor de pescado a escala de laboratorio y de planta piloto.	93
Cuadro XXVIII. Efecto de la concentración de enzima y el tiempo del tratamiento sobre diferentes características evaluadas a un gel elaborado con las proteínas obtenidas.....	99
Cuadro XXIX. Resultados de los análisis de evaluación de los modelos obtenidos en el tratamiento enzimático del licor de pescado para las diferentes variables respuesta.	100
Cuadro XXX. Propiedades gelificantes de las gelatinas del licor de alimentación, el retenido y el permeado en el proceso de MF utilizando una membrana de 0,8 µm de diámetro de poro. .	104
Cuadro XXXI. Propiedades gelificantes de las gelatinas del licor de alimentación, el retenido y el permeado en el proceso de UF utilizando una membrana de 100 nm de diámetro de poro.	106
Cuadro XXXII. Propiedades gelificantes de las gelatinas del licor de alimentación, el retenido y el permeado en el proceso de UF utilizando una membrana de 50 nm de diámetro de poro.	109

Cuadro XXXIII. Propiedades gelificantes de las gelatinas del licor de alimentación, el retenido y el permeado en el proceso de UF utilizando una membrana de 20 nm de diámetro de poro. 111

Cuadro XXXIV. Propiedades gelificantes de las gelatinas del licor de alimentación y las 5 fracciones obtenidas en el proceso de filtración en serie. 113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relación entre el valor unitario y la demanda de mercado de productos extraídos de subproductos pesqueros, según su uso industrial. Adaptado de Penven et al. (2013).....	10
Figura 2. Estructura molecular de los principales aminoácidos del colágeno y la gelatina.....	12
Figura 3. (a) Estructura de colágeno nativo, (b) colágeno hidratado después del tratamiento ácido/alcalino, (c) posibles moléculas de gelatina extraídas con agua caliente: (i) 1 cadena γ , (ii) 1 cadena β y 1 cadena α , (iii) 3 cadenas α	15
Figura 4. Proceso convencional para la obtención de gelatina. Adaptado de Karayannakidis y Zotos (2016).	18
Figura 5. Esquema del modelo de 2 platos para la evaluación de pruebas oscilatorias.	24
Figura 6. Relación de τ y γ respecto al tiempo y δ de acuerdo al comportamiento del material: a) elástico ideal, b) viscoso ideal y c) viscoelástico.	25
Figura 7. Diagrama vectorial de la relación entre G' , G'' y G^*	26
Figura 8. Componentes retenidos por la membrana en la OI. Fuente: GEA (2007).	31
Figura 9. Componentes retenidos por la membrana en la NF. Fuente: GEA (2007).	32
Figura 10. Componentes retenidos por la membrana en la UF. Fuente: GEA (2007).	33
Figura 11. Componentes retenidos por la membrana en la MF. Fuente: GEA (2007).	33
Figura 12. Principio de filtración tangencial. Fuente GEA (2007).	36
Figura 13. Proceso general para la obtención de compuestos proteicos funcionales a partir de subproductos de la industria pesquera.	38
Figura 14. Flujo de proceso de elaboración de lomos de atún fresco en la empresa Tunatun S.A. Fotografías: a) atún descongelado; b) extracción de los lomos, y c) pieles de atún.	48
Figura 15. Flujo de proceso para la preparación de la piel de atún para realizar las pruebas a nivel de laboratorio y de planta piloto.....	49
Figura 16. Flujo de proceso de la extracción del licor de pescado en el laboratorio.	50
Figura 17. Flujo de proceso de la extracción del licor de pescado a escala de planta piloto.	58
Figura 18. Diagrama del fraccionamiento de proteínas por tecnología de membranas.....	64
Figura 19. Diagrama del equipo de MFT/UFT.....	65
Figura 20. Efecto de la concentración del ácido acético sobre la hidratación de la piel de atún.	76
Figura 21. Efecto de la concentración del ácido acético sobre la masa de licor de pescado.	76

Figura 22. Efecto de la concentración del ácido acético sobre el pH de un gel (6,67% m/v) elaborado con la proteína extraída de la piel de atún.....	78
Figura 23. Efecto de la concentración del ácido acético sobre la fuerza del gel elaborado con la proteína extraída de la piel de atún.....	79
Figura 24. Electroforesis SDS-PAGE de las proteínas obtenidas de la piel de atún para la optimización del pretratamiento ácido. APM: Alto peso molecular; STD: Estándar.	80
Figura 25. Efecto del tiempo y de la temperatura de extracción sobre la temperatura de gelificación de la gelatina de piel de atún.....	86
Figura 26. Efecto del tiempo y de la temperatura de extracción sobre la temperatura de fusión de la gelatina de piel de atún.....	86
Figura 27. Efecto del tiempo y de la temperatura de extracción sobre la fuerza del gel elaborado con la gelatina extraída de la piel de atún.....	87
Figura 28. Electroforesis SDS-PAGE de las proteínas obtenidas de la piel de atún para la optimización de la etapa de extracción. APM: alto peso molecular; STD: Estándar; BPM: bajo peso molecular.....	88
Figura 29. Deseabilidad en función del tiempo y de la temperatura de extracción para la maximización de las temperaturas de gelificación y fusión de la gelatina extraída de la piel de atún.	90
Figura 30. Evaluación del efecto de la escala del proceso sobre la fuerza de gel y temperaturas de gelificación y fusión de las gelatinas obtenidas (barras indican intervalo de confianza al 95%, n = 3). Barras con letras diferentes son significativamente diferentes (p < 0,05).	96
Figura 31. Electroforesis SDS-PAGE de las proteínas obtenidas de la piel de atún según la escala del proceso (L: laboratorio, PP: Planta piloto). APM: alto peso molecular; STD: Estándar; BPM: bajo peso molecular.....	96
Figura 32. Electroforesis SDS-PAGE de las proteínas obtenidas del licor de piel de atún para la evaluación del tratamiento enzimático del licor. STD: Estándar.	101
Figura 33. Flujo de permeado respecto al FRV en la microfiltración de licor de pescado en una membrana de 0,8 μm (Temperatura: 60 °C; P_{tm} : 0,7-1,0 bar).	103
Figura 34. Electroforesis SDS-PAGE de las gelatinas del licor de alimentación (A), del retenido (R) y del permeado (P) en el proceso de MF utilizando una membrana de 0,8 μm de diámetro de poro. STD: Estándar.....	104
Figura 35. Flujo de permeado respecto al FRV en la ultrafiltración de licor de pescado en una membrana de 100 nm (Temperatura: 60 °C; P_{tm} : 1,2-1,4 bar).	105

Figura 36. Electroforesis SDS-PAGE de las gelatinas del licor de alimentación (A), del retenido (R) y del permeado (P) en el proceso de UF utilizando una membrana de 100 nm de diámetro de poro. STD: Estándar.....	107
Figura 37. Flujo de permeado respecto al FRV en la ultrafiltración de licor de pescado en una membrana de 50 nm (Temperatura: 60 °C; P_{tm} : 1,2-1,4 bar).	108
Figura 38. Electroforesis SDS-PAGE de las gelatinas del licor de alimentación (A), del retenido (R) y del permeado (P) en el proceso de UF, utilizando una membrana de 50 nm de diámetro de poro. STD: Estándar.....	109
Figura 39. Flujo de permeado respecto al FRV en la ultrafiltración de licor de pescado en una membrana de 20 nm (Temperatura: 60 °C; P_{tm} : 1,6-1,8 bar).	111
Figura 40. Electroforesis SDS-PAGE de las gelatinas del licor de alimentación (A), el retenido (R) y el permeado (P) en el proceso de UF utilizando una membrana de 20 nm de diámetro de poro. STD: Estándar.....	112
Figura 41. Electroforesis SDS-PAGE de las gelatinas del licor de alimentación (A), los retenidos (R0,8; R100; R50; R20) y el permeado final (P20) del proceso de fraccionamiento utilizando 4 membranas en serie. STD: Estándar.	115

LISTA DE ABREVIATURAS

APM	Alto peso molecular	P	Licor permeado
δ	Ángulo de cambio de fase	R	Licor retenido
ϕ	ángulo de deflexión	m/m	masa/masa
A_m	Área de la membrana	m/v	masa/volumen
BPM	Bajo peso molecular	MF	Microfiltración
b.h.	Base húmeda	G*	Módulo complejo de cizalla
b.s.	Base seca	G'	Módulo elástico
CITA	Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos	G''	Módulo viscoso
CENIBiot	Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas	NF	Nanofiltración
R	Coefficiente de correlación de Pearson	n.d.	No definido
R²	Coefficiente de determinación	n	Número de muestras
R²-adj	Coefficiente de determinación ajustado	FAO	Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación
Cn	Concentración	OI	Osmosis Inversa
HPLC	Cromatografía líquida de alto desempeño	s	Patrón de deflexión
DG	Deseabilidad global	PP	Planta Piloto
DCCR	Diseño central compuesto rotable	P_{tm}	Presión transmembranaria
h	Distancia entre platos	p	probabilidad
SDS-PAGE	Electroforesis de duodecilsulfato de sodio en gel de poliacrilamida	P_{fa}	Probabilidad de falta de ajuste
τ	Esfuerzo de corte	PRO	Prolina
EUA	Estados Unidos Americanos	rpm	Revoluciones por minuto
STD	Estándar	T	Temperatura
FRV	Factor de reducción volumétrica	T_f	Temperatura de fusión
J_p	Flujo de permeado	T_g	Temperatura de gelificación
J_r	Flujo de retenido	γ	Tensión, deformación o fricción
F	Fuerza de corte	t	tiempo
F_g	Fuerza del gel	UF	Ultrafiltración
GLY	Glicina	U	Velocidad tangencial
HYP	Hidroxiprolina	V_a	Volumen alimentado
L	Laboratorio	V_p	Volumen de permeado
A	Licor de alimentación	V_r	Volumen retenido

I. JUSTIFICACIÓN

La industria de alimentos genera una gran cantidad de subproductos o residuos sólidos, líquidos y gaseosos (Gowthaman et al., 2012). En el pasado, estos subproductos se descartaban sin ser tratados, produciendo un gran impacto en el medio ambiente. En las últimas décadas, especialmente por regulaciones ambientales, los residuos y subproductos se deben tratar antes de ser eliminados. Según Kader y Koshio (2012), esto es perjudicial para la industria, ya que se gasta mucho dinero en el tratamiento, aumentando los costos operacionales de las empresas sin recibir beneficios económicos. Actualmente, en la industria de alimentos se adoptan los conceptos de valorización para la reutilización de los subproductos del procesamiento de los alimentos. Hay un amplio margen para la fabricación de productos de valor agregado, incluyendo muchas biomoléculas de importancia económica que pueden contribuir, en última instancia, al desarrollo sostenible de una empresa (Chandrasekaran, 2012).

En el caso de la industria pesquera, se trabaja para agregar valor a las materias primas y cumplir con las expectativas del mercado; por lo tanto, pueden realizarse numerosas etapas de procesamiento, tales como: fileteado, descabezado, eviscerado, pelado y cortado, generando una importante cantidad de subproductos (Chowdhury et al., 2010; Penven et al., 2013; Suresh y Prabhu, 2012). Según Ferraro et al. (2010), los residuos y subproductos de la industria pesquera han crecido en los últimos años, debido a cambios en las tendencias del consumidor, como la preferencia hacia productos listos para consumir y, al aumento consistente en el consumo de productos pesqueros, especialmente porque se reconoce que tienen nutrientes saludables para el consumidor.

El procesamiento industrial de la pesca y la acuicultura para el consumo humano a nivel mundial alcanzó las 151,2 millones de toneladas en el 2016, generando entre

30,2 y 75,6 millones de toneladas de subproductos (Cardoso y Nunes, 2013; FAO, 2018; Galla et al., 2012; Suresh y Prabhu, 2012). Según Karayannakidis y Zotos (2016), a pesar de sus componentes valiosos, algunos subproductos pesqueros se arrojan en vertederos o en los océanos, con potenciales efectos negativos para el ambiente, o se utilizan para elaborar productos de bajo valor añadido. Lopes et al. (2015) indican que la reutilización y valorización de subproductos pesqueros son procesos claves para la conservación de los recursos marinos. Por lo general, las fábricas de harina y aceite de pescado procesan los subproductos de los puertos e industria pesquera, produciendo beneficios económicos para todas las partes: las empresas de valorización pueden obtener productos con valor añadido, mientras las empresas pesqueras disminuyen sus costos de gestión de residuos.

La utilización de los subproductos de la pesca se ha convertido en una industria importante en varios países. En este momento, la mayoría de los subproductos de la industria pesquera se utiliza para la producción de harina y aceite de pescado, siendo la harina de pescado el producto de consumo no humano más valioso (Ferraro et al., 2010). El aceite de pescado puede o no ser para consumo humano, dependiendo de su composición y manejo. Entre los usos para consumo humano se destaca la elaboración de grasas alimentarias y se puede utilizar también para la producción de jabón, glicerol, aceites hidráulicos o fertilizantes (Ferraro et al., 2010).

Los subproductos de pescado contienen muchos compuestos de interés para diversos sectores, ofreciéndoles un gran valor que sin duda es subutilizado en la actualidad (Penven et al., 2013). Por ejemplo, contienen proteínas, vitaminas, minerales y aceites; también son fuentes ricas de compuestos funcionales como péptidos, pigmentos, enzimas, colágeno y gelatina (Suresh y Prabhu, 2012). Estos compuestos podrían tener muchos usos en las industrias médica, farmacéutica y alimentaria, entre otras; sin embargo, su recuperación, fraccionamiento y purificación son claves de éxito, debido a que los sectores industriales que los utilizan necesitan moléculas específicas según el tipo de subproducto (por ejemplo, el colágeno de las pieles), a veces hasta en especies

específicas, como el aceite de hígado de tiburón “Siki” (*Centroscymnus coelolepis*) para la industria aeronáutica (Penven et al., 2013).

La extracción de compuestos de alto valor agregado, junto con el desarrollo de nuevas tecnologías para la recuperación y purificación, aportará a largo plazo a la sostenibilidad de la industria pesquera (Ferraro et al., 2010). Saidi et al. (2014) mencionan que, comparadas con otros métodos de separación como la cromatografía en gel, las tecnologías de membrana ofrecen muchas ventajas, como una mayor productividad, menor capital de inversión, mayor concentración y mantenimiento de la calidad del producto en condiciones ambientales, mayor facilidad de escalamiento y de limpieza del equipo. Técnicas de separación de membrana como la microfiltración (MF), nanofiltración (NF), ultrafiltración (UF) y la filtración con electro-membrana proporcionan una tecnología potencial para la industria al elaborar productos enriquecidos de proteínas y péptidos marinos de pesos moleculares específicos (Bourseau et al., 2009; Cardoso y Nunes, 2013).

Según Diná Afonso et al. (2004) una de las características más interesantes de la UF y la NF, en comparación con otros procesos de concentración, es que logran concentrar de una manera energéticamente eficiente, ya que la operación se lleva a cabo sin cambio de fase. Por ejemplo, cuando se compara un proceso de UF con una evaporación de una sola etapa se obtiene una relación teórica de consumo energético de 1:1100, respectivamente.

En Costa Rica, los subproductos de la industria pesquera se descartan o se utilizan en la producción de harina y aceite de pescado (para el caso de los materiales sólidos) o de biogás en estación depuradora de aguas residuales (para las aguas de cocción). Sin embargo, no se han implementado con éxito procesos a escala industrial para elaborar productos de mayor valor agregado a partir de estos subproductos.

En este proyecto se considera que, para el caso del atún, es posible pensar en la extracción y el posterior fraccionamiento de las proteínas de la piel utilizando

tecnologías de membranas, para recuperar diferentes compuestos de alto valor añadido por su funcionalidad tecnológica como aromas de pescado, gelificantes o espesantes. Si se logran generar opciones de valorización de este subproducto, la industria podrá diversificar su oferta ampliando su gama de productos, con concentrados proteicos de alto valor nutricional y funcional que se están cotizando bien en el mercado internacional. Asimismo, la industria nacional dispondrá de nuevas alternativas para la valorización de subproductos actualmente subutilizados, mediante la implementación de nuevas tecnologías y procesos para la elaboración de productos con acceso al mercado local e internacional. Es en este contexto, que se plantea como objetivo general de este proyecto el evaluar el proceso de extracción y el proceso de fraccionamiento de proteínas mediante la aplicación de tecnologías de membranas, a partir de un subproducto obtenido del procesamiento industrial de pescado.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el proceso de extracción y el proceso de fraccionamiento de proteínas mediante la aplicación de tecnologías de membranas, a partir de un subproducto obtenido del procesamiento industrial de pescado.

2.2 Objetivos específicos

- I. Optimizar el pretratamiento ácido de la piel de atún y el proceso de extracción para obtener un mayor rendimiento de extracción de la proteína a escala de laboratorio, aplicando la metodología de superficie de respuesta.
- II. Realizar el escalamiento del proceso de extracción de proteínas a nivel de planta piloto para obtener el licor de pescado desengrasado (materia prima para el proceso de fraccionamiento).
- III. Evaluar la aplicación de diferentes tecnologías de membranas en el licor de pescado para obtener fracciones de proteínas con diferentes pesos moleculares y características funcionales.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 La industria pesquera y sus subproductos

La actividad pesquera es una importante fuente de alimentos e ingresos para cientos de millones de personas en todo el mundo. Según la FAO (2018), el consumo aparente de pescado per cápita a nivel mundial registró un aumento de un promedio de 9,0 kg en 1961 a 20,3 kg en 2013. El aumento del consumo de pescado ha mejorado la alimentación de las personas en todo el mundo, gracias a alimentos diversificados, nutritivos y saludables (Cardoso y Nunes, 2013; Lopes et al., 2015; Shahidi et al., 2007).

En 2013, el pescado representó alrededor del 6,7% de las proteínas totales consumidas por la población mundial (FAO, 2016); estas proteínas son de fácil digestión y alta calidad, ya que contienen todos los aminoácidos esenciales. Además de la proteína, el pescado proporciona nutrientes funcionales que permiten regular el funcionamiento del organismo y evitan enfermedades, como grasas esenciales (por ejemplo, ácidos grasos omega 3 de cadena larga), vitaminas (D, A y B) y minerales (como calcio, yodo, zinc, hierro y selenio) (Cardoso y Nunes, 2013; FAO, 2016; Vazhiyil, 2008).

La producción mundial de productos pesqueros se ha incrementado en los últimos años (ver Cuadro I), especialmente por el exponencial crecimiento de la producción por acuicultura, ya que la pesca por captura se estabilizó desde los años 90. La producción pesquera se utiliza principalmente para el consumo humano, aumentando su proporción del 67% en la década de 1960 hasta un 88% en el 2016. Las restantes 19,7 millones de toneladas se utilizan en productos no alimentarios, principalmente para la producción de harina y aceite (FAO, 2016; FAO, 2018).

Cuadro I. Producción y utilización de la pesca y la acuicultura en el mundo.

Año	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Producción (millones de toneladas)						
<i>Captura</i>	92,2	89,6	90,5	91,2	92,6	90,9
<i>Acuicultura</i>	61,8	66,4	70,2	73,7	76,1	80,0
Utilización (millones de toneladas)						
<i>Consumo humano</i>	130,0	135,4	140,1	144,9	148,4	151,2
<i>No alimentario</i>	24,0	19,6	20,6	20,0	20,3	19,7
Total	154,0	156,0	160,7	164,9	168,7	170,9

Fuente: FAO (2018).

Los últimos informes elaborados por especialistas, organizaciones internacionales, la industria y representantes de la sociedad civil coinciden en destacar el enorme potencial (que será incluso mayor en el futuro) que tienen los océanos y las aguas continentales de contribuir de forma destacada a la seguridad alimentaria y la nutrición adecuada de una población mundial que se prevé alcance los 9 700 millones de habitantes en 2050 (FAO, 2016).

El procesamiento industrial de mariscos y pescado para el consumo humano genera una enorme cantidad de subproductos (entre 20% y 50%) que provienen de porciones no comestibles o infrautilizadas (Cardoso y Nunes, 2013; FAO, 2016; Ferraro et al., 2010; Galla et al., 2012; Suresh y Prabhu, 2012). Según Arvanitoyannis y Kassaveti (2008), Kristinsson y Rasco (2000) y Ferraro et al. (2010) más del 50% del material restante de la captura total de pescado no se utiliza, alcanzando casi 32 millones de toneladas de productos no valorizados.

Para cumplir con las expectativas del mercado actual, la industria pesquera procesa sus materias primas para ofrecer productos de alta calidad, generando subproductos como las cabezas, vísceras, recortes, huesos de pescado o cartílagos y colas, pieles, huevos y efluentes (con un alto contenido de sustancias orgánicas y grasa) (Kim et al. 2013; Kim y Mendis, 2006; Mireles DeWitt et al., 2013; Penven et al., 2013; Sila et al., 2017;

Suresh y Prabhu, 2012). Por ejemplo, la industria de enlatados sólo utiliza la parte comestible de los peces; lo habitual es cortar la cabeza, aletas y cola, y eliminar todas las vísceras. A veces se desecha también la columna vertebral, la piel y la carne oscura, generando entre un 20-50% de subproductos sólidos respecto a la materia prima (Chakrabarti, 2005). Ferraro et al. (2010) indican que la industria de fileteo, salado y ahumado de pescado genera entre un 50-75% de subproductos sólidos respecto a la materia prima. En la elaboración de surimi los subproductos sólidos representan del 50% al 70% de la materia prima, dependiendo del método de extracción de la carne de la canal. Estos subproductos son una mezcla de cabezas, vísceras, piel, espinas y la carne sobrante (Mireles DeWitt et al., 2013).

El manejo de los desechos de la industria pesquera se ha convertido en un problema por su impacto en el ambiente, por lo que una estrategia de reducción de desechos es la recuperación de productos comerciales de estos subproductos (Arvanitoyannis y Kassaveti, 2008). Los subproductos pesqueros están disponibles como una fuente potencial de materia prima para recuperar componentes valiosos (ver Cuadro II) (Kim y Mendis, 2006; Suresh y Prabhu, 2012).

Cuadro II. Subproductos del proceso de pescado y sus compuestos valiosos

Subproductos	Porcentaje de subproducto (%)	Compuestos valiosos
<i>Cabezas</i>	14-20	Colágeno, gelatina, aceite, lípidos, proteínas, péptidos, escualeno, cartílago, calcio, aromas.
<i>Vísceras</i>	15-20	Aceite, lípidos, proteínas, péptidos, escualeno, enzimas, aromas.
<i>Piel</i>	1-3	Colágeno, gelatina, elastina, cartílago.
<i>Espinass</i>	10-16	Colágeno, gelatina, cartílago, calcio y otros minerales.
<i>Efluentes</i>	1-5	Proteínas, péptidos.

Fuente: Suresh y Prabhu (2012).

Ferraro et al. (2010) indican que la concentración de compuestos valiosos, como minerales, proteínas y lípidos, suelen ser mayores en las fracciones que se descartan, como las cabezas de pescado, vísceras, piel, colas y sangre. Por lo tanto, es necesario estudiar la viabilidad del tratamiento de los subproductos no sólo por razones ambientales, sino también desde el punto de vista económico (Penven et al., 2013; Ranadheera y Janak, 2014; Saidi et al., 2014).

3.2 Valorización de subproductos de la industria pesquera

La industria pesquera, además de agregar valor a sus productos principales, trata de maximizar la rentabilidad de sus operaciones, desarrollando mercados para sus subproductos, con lo cual pueden obtener un beneficio económico por la venta de estos productos secundarios y reducir los costos de tratar sus desechos (Bechtel, 2003). Cada vez más, la utilización de subproductos se está convirtiendo en una industria importante y se confiere una importancia creciente a su manipulación de forma controlada, segura e higiénica, con lo que además se reduce el desperdicio (FAO, 2016; Shahidi et al., 2007).

Para la valorización de subproductos pesqueros se mencionan dos grandes grupos de procesamiento: la explotación en masa (para la producción de alimentación animal, energía y fertilizantes) y la explotación en pequeño volumen (mayor valor agregado para generar productos que se utilizan a nivel industrial), cuyas principales diferencias son la capacidad de absorción del mercado de estos derivados y los beneficios económicos que pueden obtener los productores (Penven et al., 2013).

En la Figura 1 se representa la relación entre los volúmenes que puede absorber la industria y los beneficios económicos que se pueden generar, donde se muestra que las aplicaciones más especializadas, como los productos para la industria farmacéutica o alimentaria (complementos nutricionales y productos saludables, por ejemplo, bajos en grasas saturadas o sodio, o ingredientes funcionales con un efecto fisiológico beneficioso para el consumidor), presentan un alto valor en el mercado.

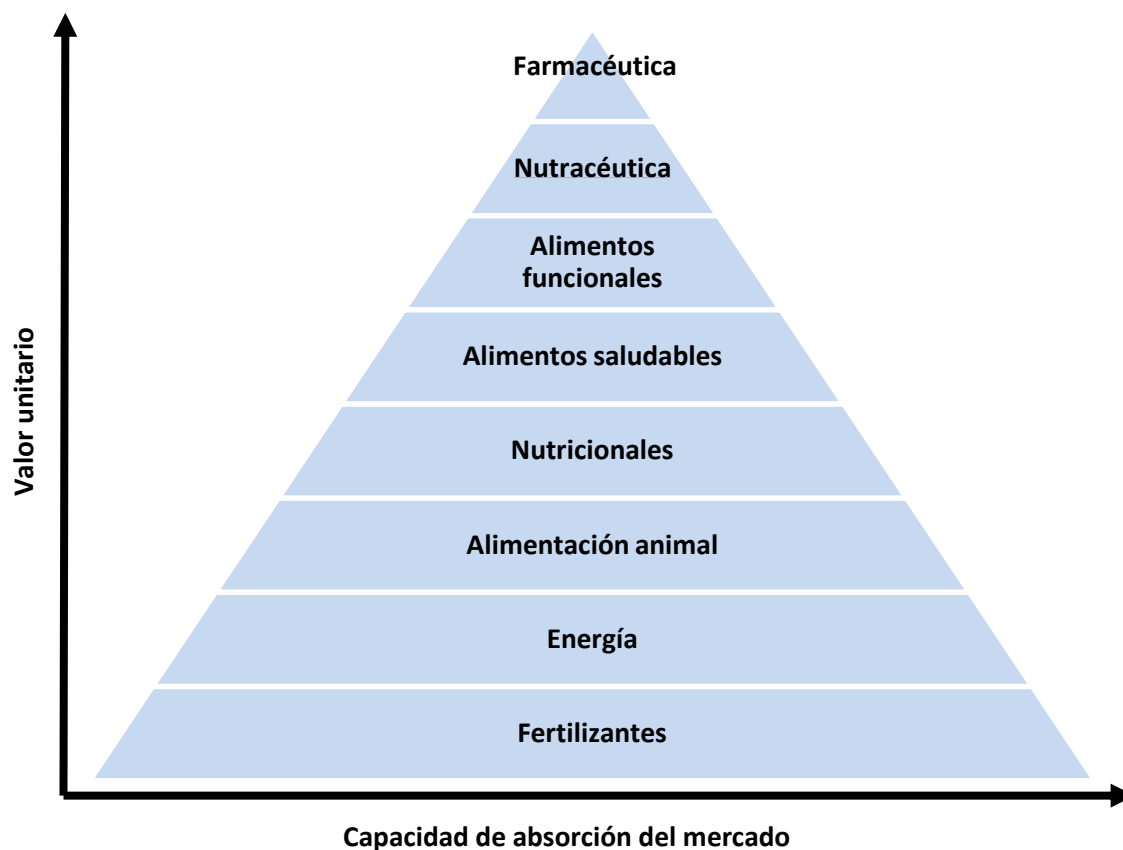


Figura 1. Relación entre el valor unitario y la demanda de mercado de productos extraídos de subproductos pesqueros, según su uso industrial. Adaptado de Penven et al. (2013).

3.2.1. Para la explotación en masa

Convencionalmente, los subproductos pesqueros se transforman en productos de bajo valor económico, como las harinas de pescado, el aceite de pescado y los fertilizantes naturales, o son simplemente desechados (Bechtel, 2003; Silva et al., 2014; Suresh y Prabhu, 2012). La producción mundial de harina de pescado fue de aproximadamente 5 millones de toneladas en 2008 y la producción de aceite de pescado fue de alrededor de 1 millón de toneladas. Los principales productores de harina de pescado y aceite de pescado son Perú y Chile (Penven et al., 2013).

Según Kader y Koshio (2012) y Lee et al. (2010a), los subproductos de la industria pesquera pueden ser reciclados como una fuente potencial de alimento de alto valor

proteico en la alimentación animal (ganado, aves y pescado). Chakrabarti (2005) y Herpandi et al. (2011) indican que la carne oscura del atún (aproximadamente un 11% del peso del atún) se puede utilizar para alimentación animal. Si bien es cierto, el valor de mercado de la harina de pescado para la alimentación animal es bajo, tiene un alto interés ya que genera beneficios ambientales y sociales al disminuir la cantidad de desechos que se generan y el costo de alimentación de la producción animal (Arvanitoyannis y Kassaveti, 2008).

3.2.2. Para la explotación en pequeño volumen

Los subproductos de la industria pesquera provienen de diferentes tipos de animales y ambientes, por lo que contienen gran variedad de compuestos de interés para diversos sectores, ofreciéndoles un gran valor potencial que es subutilizado en la actualidad (Chandrasekaran, 2012; Penven et al., 2013). Entre los compuestos que contienen estos subproductos se encuentran proteínas, vitaminas, minerales y aceites ricos en ω -3 tan buenos como los contenidos en otros productos comerciales. También son fuentes ricas de componentes nuevos y valiosos, tales como péptidos bioactivos, pigmentos, aromas, enzimas, quitina, colágeno y gelatina, entre otros (Arvanitoyannis y Kassaveti, 2008; Cardoso y Nunes, 2013; Chandrasekaran, 2012; Sanmartín et al., 2012; Suresh y Prabhu, 2012).

Según Suresh y Prabhu (2012), el procesamiento de subproductos de la industria de pescado y mariscos es uno de los más grandes biorecursos sin explotar, con un alto potencial para la derivación de los biomateriales que pueden ser utilizados en alimentos, piensos, la industria médica, farmacéutica y otras industrias de química fina, siempre que garanticen condiciones higiénicas de manipulación y almacenamiento (Cardoso y Nunes, 2013).

Arvanitoyannis y Kassaveti (2008), Karayannakidis y Zotos (2016), Pires y Batista (2013) y Ranadheera y Janak (2014) indican que se han producido numerosas investigaciones sobre la recuperación de productos útiles a partir de los subproductos marinos. Estos

compuestos funcionales o bioactivos pueden ser extraídos y aislados con tecnologías que varían desde procesos simples a complejos. Entre estos procesos se pueden incluir la preparación y el aislamiento de péptidos bioactivos, oligosacáridos, ácidos grasos, enzimas, quitina, colágeno, gelatina, minerales solubles en agua, y los biopolímeros para aplicaciones biotecnológicas y farmacéuticas.

En general, mayores beneficios económicos se pueden obtener mediante la producción de consumibles humanos (Cardoso y Nunes, 2013; Kim y Mendis; 2006). Karayannakidis y Zotos (2016) indican que los subproductos de pescado son una fuente alternativa de ingredientes proteicos, especialmente de gelatina de grado alimentario, por su alto contenido de colágeno en piel, escamas y huesos.

3.3 Gelatina de pescado

La gelatina se produce a partir del colágeno (principal proteína estructural de los huesos y las pieles de los animales) (Kim et al., 2013; McClements, 2015; te Nijenhuis, 1997). El colágeno es una proteína con una inusual composición de aminoácidos, con un alto contenido de glicina (GLY) y de prolina (PRO) e hidroxiprolina (HYP), los últimos dos con anillos de pirrolidina (ver Figura 2).

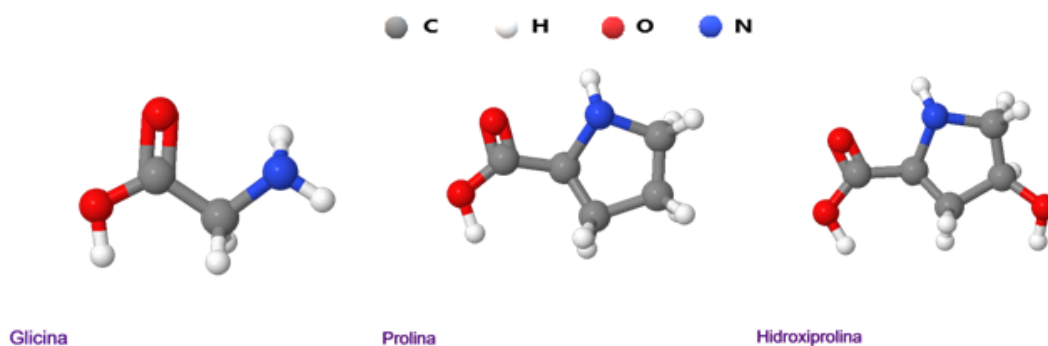


Figura 2. Estructura molecular de los principales aminoácidos del colágeno y la gelatina.

La gelatina tiene muy pocos aminoácidos aromáticos y con el grupo sulfuro (te Nijenhuis, 1997). Los polipéptidos que la componen presentan la unidad básica (GLY-X-Y)_n, conocida como tropocolágeno, donde X y Y pueden ser cualquier aminoácido,

pero más frecuentemente son PRO o HYP (da Silva et al., 2017; te Nijenhuis, 1997; Venugopal y Mazza, 2008).

La gelatina es una proteína de alto valor funcional por su capacidad única de formar geles termorreversibles (Ferraro et al., 2010; Venugopal y Mazza, 2008). La gelatina es colágeno parcialmente desnaturalizado e hidrolizado por una serie de procesos que comprenden la destrucción de la estructura secundaria del colágeno y, en la mayoría de los casos, algunas estructuras primarias y terciarias. Se compone de una mezcla heterogénea de proteínas fibrosas, biodegradables y solubles en agua con un rango de peso molecular entre los 80 y los 250 kDa (Ferraro et al., 2010; Riaz y Chaudry, 2003; te Nijenhuis, 1997).

La producción mundial de colágeno y gelatina ha tendido a crecer en los últimos años (Karim y Bhat, 2009), alcanzando una producción mundial de 348 900 toneladas métricas en el 2011 (FAO, 2014). Según Grand View Research (2016), se estima que la industria mundial de gelatina produjo 412 700 toneladas métricas en el 2015 y que alcanzará en el año 2024, 651 700 toneladas métricas con un valor de 4 080 millones de dólares americanos. Casi un 99% de la producción mundial de gelatina proviene de subproductos de animales de abasto, el restante 1% proviene de subproductos de origen marino (FAO, 2014; Karim y Bhat, 2009).

La demanda de gelatina de pescado se ha incrementado, impulsada por la oposición de algunos consumidores a adquirir gelatinas de animales de abasto, debido a brotes relacionados con subproductos de la industria cárnica, como la encefalopatía espongiiforme bovina, la fiebre aftosa o la fiebre aviar, a pesar de que no se haya encontrado evidencia de que estas enfermedades se puedan transmitir por el consumo de gelatina. Otras veces, su consumo es restringido por aspectos socioculturales, especialmente por la religión, en algunos países (Ferraro et al., 2010; Kim et al., 2013; Kim y Mendis, 2006; Lin et al., 2017; Venugopal y Mazza, 2008).

Sin embargo, la gelatina de pescado tiene algunos inconvenientes respecto a la gelatina de mamíferos, tales como, una menor estabilidad, menor fuerza de gel, menores temperaturas de fusión y gelificación, un color oscuro, un leve olor a pescado y un costo mayor (Ferraro et al., 2010; Kim et al., 2013). La menor estabilidad térmica de las gelatinas de pescado se debe a su menor contenido de aminoácidos con grupo α -amino secundario respecto a la gelatina de los mamíferos y aves. Este contenido es menor en peces de aguas frías (Díaz-Calderón et al., 2017; te Nijenhuis, 1997).

Karayannakidis y Zotos (2016) indican que investigadores de muchos países están trabajando en la transformación de los subproductos pesqueros locales para la obtención de gelatina. La lista de especies investigadas se vuelve interminable, pero se puede hablar en términos generales que el proceso depende del subproducto a tratar: piel, escamas y huesos, etc.

3.3.1 Elaboración

La gelatina se produce a partir de subproductos con altos contenidos de colágeno, proteína estructural que posee una conformación de triple hélice, un alto peso molecular, un pequeño rango de distribución de tamaño molecular, punto isoeléctrico básico, alta capacidad de formación de fibras y resistencia a la acción de proteasas (Kim et al., 2013). Las características y comportamiento de las gelatinas se relacionan estrechamente con su fuente, pero también con su proceso de obtención. La gelatina se puede extraer por tratamiento ácido o básico, asistidos por agua y calor (Díaz-Calderón et al., 2017; Ferraro et al., 2010).

Al convertirse en gelatina se genera una desnaturalización e hidrólisis del colágeno, generando gelatinas con cadenas α , β (2 cadenas α) y γ (3 cadenas α) (ver Figura 3), obteniendo una proteína de menor peso molecular, con mayor rango de distribución de tamaño, menor punto isoeléctrico, ninguna resistencia a la hidrólisis por proteasas y sin capacidad de formar fibras (Kim et al., 2013). Después de la extracción, se obtiene

la gelatina final, un producto incoloro, quebradizo e insípido, en forma de láminas, copos o polvo.

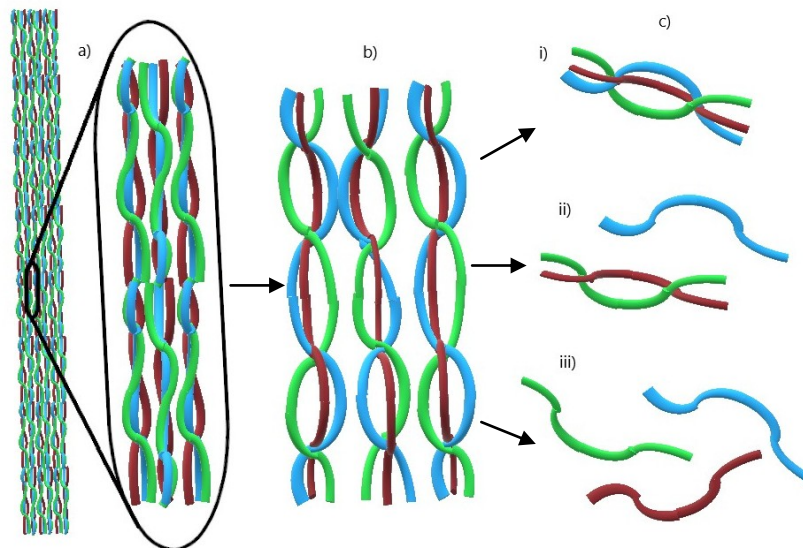


Figura 3. (a) Estructura de colágeno nativo, (b) colágeno hidratado después del tratamiento ácido/alcalino, (c) posibles moléculas de gelatina extraídas con agua caliente: (i) 1 cadena γ , (ii) 1 cadena β y 1 cadena α , (iii) 3 cadenas α .

3.3.1.1 Pretratamiento

La gelatina se puede extraer sin un tratamiento previo utilizando agua caliente; sin embargo, el rendimiento y calidad del producto son mayores si se aplica un pretratamiento a los tejidos (Kim et al., 2013). El aumento en el rendimiento se presenta porque los pretratamientos hidratan las moléculas de colágeno, modificando el balance eléctrico del medio y rompiendo enlaces covalentes intra e intermoleculares en el colágeno, lo cual facilita la hidrólisis del colágeno y su solubilidad en el proceso de extracción con agua caliente (Ahmad et al., 2017).

Se pueden clasificar los pretratamientos en dos métodos: el alcalino y el ácido. El tratamiento con una solución básica se aplica a los huesos del ganado y puede durar más de 20 semanas para generar gelatina tipo B, con un pH entre 5 y 7, un punto isoeléctrico de 5 y una dureza y viscosidad mayor que la gelatina tipo A (Kim et al.,

2013; McClements, 2015; Wasswa et al., 2007). El tratamiento con solución ácida se aplica a los subproductos de pescado y de cerdo, toma menos tiempo que el proceso básico, y produce gelatina tipo A, con un pH entre 3 y 6 y un punto isoeléctrico entre 7 y 9, tipo de gelatina más utilizada en la industria (Kim et al., 2013; McClements, 2015; Wasswa et al., 2007).

Benjakul et al. (2009) indican que el ácido desestabiliza la estructura de triple hélice del colágeno, ya que separa uniones cruzadas ácido lábiles, enlaces de amida y enlaces no covalentes intra e inter moleculares. Según Ahmad et al. (2017), la hidratación del colágeno y su posterior solubilización son influenciadas por el pH, la temperatura y el tiempo aplicado en ambos tratamientos. En el Cuadro III se presentan ejemplos de investigaciones donde se utiliza el tratamiento ácido para la obtención de gelatina de subproductos pesqueros.

Cuadro III. Condiciones de proceso empleadas en el pretratamiento con ácido utilizado en la extracción de gelatina de subproductos de la industria pesquera.

Subproducto	Ácido	Concentración	Relación subproducto:solución	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Fuente
Piel de salmón del atlántico (<i>Salmo solar</i>)	Sulfúrico Cítrico	0,12 M 0,005 M	1:3,3 1:3,3	0,5 0,5	n.d. n.d.	Arnesen y Gildberg (2007)
Piel de pargo ojón (<i>Priacanthus tayenus</i> y <i>Priacanthus macracanthus</i>)	Acético	0,2 M	1:10	2	n.d.	Benjakul et al. (2009)
Piel de Jurel (<i>Trachurus trachurus</i>)	Sulfúrico	0,2%	1:4	4	10	Badii y Howell (2006)
Vejiga natatoria carpa india (<i>Catla catla</i>)	Sulfúrico Cítrico	0,1 M 0,5 %	1:7 1:7	2 2	n.d. n.d.	Chandra y Shamasundar (2015)
Piel de tilapia (<i>Tilapia zillii</i>)	Clorhídrico	0,05 M	1:3	0,5	5	Chen et al. (2015)
Piel de pez gato gigante (<i>Pangasianodon gigas</i>)	Acético	0,05 M	1:10	3	24-26	Jongjareonrak et al. (2010)

n.d.: No definido

Cuadro III (continuación). Condiciones de proceso empleadas en el pretratamiento con ácido utilizado en la extracción de gelatina de subproductos de la industria pesquera.

Subproducto	Ácido	Concentración	Relación subproducto:solución	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Fuente
Piel de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) y pez gato de canal (<i>Ictalurus punctatus</i>)	Sulfúrico Cítrico	0,2% 0,2%	1:7 1:7	0,66 0,66	n.d. n.d.	Zhang et al. (2016)
Piel de lenguado (<i>Solea vulgaris</i>)	Acético	0,05 M	n.d.	3	10	Gómez-Guillén et al. (2005)
Piel de esturión (<i>Acipenser baeri</i>)	Acético	0,075 M	1:6	1	0-4	Hao et al. (2009)
Piel de trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Acético	0,01 a 0,21 N	1:3	1-3	7	Tabarestani et al. (2010)
Piel pez ballesta (<i>Balistes capriscus</i>)	Acético	0,05 M	1:10	6	4	Jellouli et al. (2011)
Piel de pez unicornio (<i>Aluterus monoceros</i>)	Fosfórico	0,05 M	1:10	12	Ambiente	Kaewruang et al. (2013b)

n.d.: No definido

Otro posible pretratamiento que se puede utilizar es la aplicación de enzimas, específicamente de proteasas, para hidrolizar el colágeno antes de la extracción. Ahmad et al. (2017) indican que la utilización de proteasas aumenta el rendimiento de extracción de las gelatinas respecto a los dos pretratamientos tradicionales; sin embargo, se produce una gelatina de menor fuerza de gel y temperatura de fusión, debido a la hidrólisis excesiva de las gelatinas con cadenas α y β .

3.3.1.2 Extracción

La gelatina se extrae de los subproductos pretratados utilizando agua caliente (ver Figura 4). La extracción se produce por la hidrólisis y la solubilización del colágeno, generando una solución de proteínas de variado peso molecular. Posteriormente, el

licor se desodoriza, filtra, esteriliza y concentra, el licor concentrado se enfría para que gelifique y se seca hasta obtener una humedad menor al 15%; posteriormente se muele y tamiza (Kim et al., 2013).

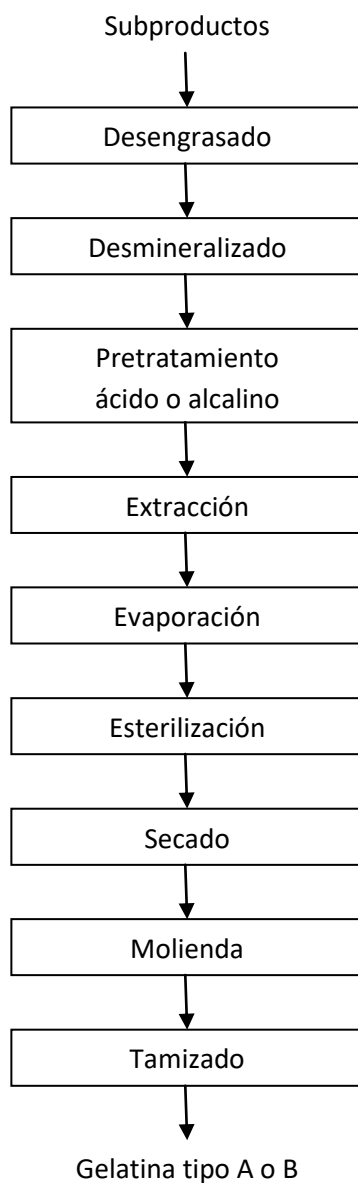


Figura 4. Proceso convencional para la obtención de gelatina. Adaptado de Karayannakidis y Zotos (2016).

Los factores que más influyen en el proceso de extracción de la gelatina son la temperatura, el tiempo y el pH. En términos generales, se presentan mejores

características de gelificación cuando se trabaja con temperaturas bajas y tiempos cortos; sin embargo, se obtienen mayores rendimientos al aumentar estos 2 parámetros. Por esta razón, en la industria se suele utilizar una extracción en etapas, donde se realizan extracciones en diferentes intervalos de temperatura, iniciando entre los 50-60 °C hasta alcanzar temperatura de ebullición (Ahmad et al., 2017; Riaz y Chaudry, 2003). De esta manera se obtienen fracciones con diferentes calidades y un buen rendimiento global. En el Cuadro IV se presentan ejemplos de parámetros de extracción utilizados en investigaciones recientes para la obtención de gelatina de subproductos pesqueros.

Cuadro IV. Condiciones de proceso empleadas para extraer gelatina de subproductos de la industria pesquera.

Subproducto	Relación subproducto:agua	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Rendimiento de extracción (% b.h.) ¹	Fuente
Piel de salmón del atlántico (<i>Salmo solar</i>)	1:1 1:1	2 2	56 65	10,1 1,4	Arnesen y Gildberg (2007)
Piel de pargo ojón (<i>Priacanthus tayenus</i> y <i>Priacanthus macracanthus</i>)	n.d.	12	45	6,41-7,93	Benjakul et al. (2009)
Piel de Jurel (<i>Trachurus trachurus</i>)	n.d.	<12	45	n.d.	Badii y Howell (2006)
Vejiga natatoria carpa india (<i>Catla catla</i>)	n.d.	17	45-50	13,5	Chandra y Shamasundar (2015)
Piel de tilapia (<i>Tilapia zillii</i>)	n.d.	1	80	n.d.	Chen et al. (2015)
Piel de pez gato gigante (<i>Pangasianodon gigas</i>)	1:10	12	44-46	20,1	Jongjareonrak et al (2010)
Piel de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) y pez gato de canal (<i>Ictalurus punctatus</i>)	n.d.	12	45	80,6-93.2 (b.s.)	Zhang et al. (2016)
Piel de lenguado (<i>Solea vulgaris</i>)	n.d.	16-18	45	3,4-22,8	Gómez-Guillén et al. (2005)
Piel de esturión (<i>Acipenser baeri</i>)	1:3	18	50	2,50-3,52	Hao et al. (2009)
Piel de trucha arcoíris (<i>Orcohynchus mykiss</i>)	1:3	14-18	50	9,36	Tabarestani et al. (2010)
Piel pez ballesta (<i>Balistes capricus</i>)	1:10	18	50	5,67	Jellouli et al. (2011)
Piel de pez unicornio (<i>Aluterus monoceros</i>)	1:10	9-15	65-75	4,0-10,7	Kaewruang et al. (2013a)
Piel de calamar (<i>Loligo vulgaricus</i>)	n.d.	18	50	6,82	Abdelmalek et al. (2016)

n.d.: No definido; b.h.: Base húmeda; b.s.: Base seca

Cuadro V (continuación). Condiciones de proceso empleadas para extraer gelatina de subproductos de la industria pesquera.

Subproducto	Relación subproducto:agua	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Rendimiento de extracción (% b.h.) ¹	Fuente
Piel de pulpo (<i>Octopus vulgaris</i>)	n.d.	4	40	3,21-7,78	Jridi et al. (2015)
Piel de Blenny Zebra (<i>Salaria basilisca</i>)	n.d.	8	50	14,65	Ktari et al. (2014)
Piel de tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	1:4	3	50	10,52-22,4	Niu et al. (2013)

n.d.: No definido; b.h.: Base húmeda; b.s.: Base seca

3.3.2 Propiedades funcionales

Los compuestos proteicos de origen pesquero tienen potenciales aplicaciones como ingredientes funcionales en los alimentos, ya que poseen muchas propiedades útiles, como la capacidad de retención de agua, la capacidad de absorción de aceite, la solubilidad de proteínas, la capacidad de gelificación, la formación y estabilización de espumas y la capacidad de emulsificación (Beaulieu et al., 2009; Chalamaiah et al., 2012).

Específicamente para la gelatina, Ferraro et al. (2010) y Lin et al. (2017) indican que se utiliza en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética como un ingrediente que mejora la elasticidad, la consistencia y la estabilidad de los productos. A pesar de su bajo valor biológico, la gelatina y el colágeno se utilizan en la industria médica y farmacéutica, especialmente por su biocompatibilidad y biodegradabilidad en entornos fisiológicos (Young et al., 2005).

Las propiedades funcionales de la gelatina se pueden dividir en 2 grupos, el primero relacionado con sus propiedades de gelificación (fuerza de gel, viscosidad, temperatura de gelificación y fusión) y el segundo grupo relacionado con el comportamiento de superficie de la gelatina (formación de espuma, estabilización de emulsiones, formación de películas) (Karayannakidis y Zotos, 2016). Según Fan et al. (2017), Kristinsson y Rasco (2000), Liu et al. (2014) y Najafian y Babji (2012), el peso molecular de los compuestos, la hidrofobicidad, la secuencia de aminoácidos y los grupos polares

de los hidrolizados afectan directamente las propiedades funcionales y, por lo tanto, sus posibles usos como ingredientes alimentarios.

3.3.2.1 Propiedades gelificantes

Un gel es una fase intermedia entre un sólido y un líquido. Técnicamente, se define como un sistema sustancialmente diluido que no presenta flujo constante. La gelificación de la proteína se refiere a la transformación de la proteína desde el estado soluble (material viscoso) a un estado similar a un gel (material elástico) (Tahergorabi et al., 2011).

Una de las principales características de la gelatina es su capacidad de formar geles termorreversibles en agua (Kim et al., 2013). Para formar geles de gelatina, primero se deben calentar las soluciones de gelatina en agua, provocando que las moléculas tomen una configuración espiral al azar, y posteriormente, se debe enfriar la solución por debajo de una temperatura crítica de gelificación. Durante este enfriamiento las moléculas recuperan su conformación nativa, pasando de espirales a hélices (Karayannakidis y Zotos, 2016). La formación de la red del gel se presenta por la interacción entre varias cadenas del polímero en varias zonas de unión (formadas por las hélices triples), formando un gel físico, ya que dichas uniones son por fuerzas de van der Waals o puentes de hidrógeno (Karim y Bhat, 2009). Durante el tiempo de enfriamiento, el gel asume gradualmente su configuración más estable; por lo tanto, las características finales del gel dependen del tiempo y la temperatura de enfriamiento (Karayannakidis y Zotos, 2016).

Las propiedades reológicas del gel son definidas por las características de las proteínas que lo conforman, que dependen de la fuente (especie de marisco o pescado), la frescura, el pH, la fuerza iónica, la temperatura, la concentración de proteínas y otros (Tahergorabi et al., 2011). La fuerza del gel y la temperatura de fusión son las propiedades reológicas más importantes de la gelatina, definen su interés comercial y sus potenciales usos (Karim y Bhat, 2009; Lin et al., 2017). Estas propiedades se

correlacionan con el peso molecular, la proporción de aminoácidos prolina e hidroxiprolina y la proporción de cadenas α/β (Haug et al., 2004; Karim y Bhat, 2009; Kim et al., 2013).

Las gelatinas de mamíferos contienen entre un 20 y 24% de prolina e hidroxiprolina, y las de pescado entre un 16 y 20%, generando importantes diferencias reológicas entre estas fuentes (Ferraro et al., 2010). Baziwane y He (2003) indican que la gelatina de pescados de aguas cálidas (como el atún) pueden tener características similares a las de la gelatina de piel de cerdo, ya que tienen más cantidad de prolina e hidroxiprolina respecto a los peces de aguas frías, como el bacalao.

3.3.2.1.1 Fuerza de gel

La fuerza de gel que presenta la gelatina depende en gran medida de su peso molecular. Estudios recientes indican que la fuerza de gel de la gelatina se correlaciona positivamente con la proporción de cadenas α y β , y las fracciones con pesos moleculares mayores a 200 kDa, y negativamente con las cadenas con pesos moleculares inferiores a los 100 kDa (Eysturskarð et al., 2009b). Según Karayannakidis y Zotos (2016), en gelatina de pescado de agua fría se ha correlacionado positivamente el modulo viscoso dinámico (relacionado con el comportamiento sólido) con las fracciones de cadenas β y de mayor peso molecular, y negativamente con las fracciones de cadena α o de menores pesos moleculares.

Comercialmente, la fuerza de gel se expresa como grados o valor Bloom, que se define como el peso en gramos necesario para que un cilindro de 12,7 mm de diámetro penetre 4 mm una gelatina de concentración 6,67% (m/m), la cual se maduró a 10 °C entre 16 y 18 horas en jarras estándar de Bloom. El valor Bloom de las gelatinas comerciales está en el rango entre 50 g y 300 g, donde se considera un Bloom bajo valores menores a 100 g, Bloom intermedio valores entre 100 g y 200 g y un Bloom alto valores mayores a los 200 g. Las gelatinas con valores entre 250 g y 260 g son las más utilizadas (Haug y Draget, 2009; Karim y Bhat, 2008; Lin et al., 2017). Sin embargo,

por cuestiones de cantidad de muestra o temperaturas bajas de gelificación, muchos investigadores modifican el método estándar para medir la fuerza de gel (Karayannakidis y Zotos, 2016), comúnmente variando las dimensiones del gel y la temperatura de maduración.

3.3.2.1.2 Temperaturas de gelificación y fusión

Las temperaturas de gelificación y fusión se consideran parámetros importantes de la preparación y comercialización de las gelatinas. Para la gelatina de pescado las temperaturas de gelificación oscilan entre los 8 °C y 25 °C y la de fusión entre los 11 °C y 28 °C (Karayannakidis y Zotos, 2016). Según Ferraro et al. (2010), aproximadamente un 10% de la gelatina de pescado de agua caliente y de cerdo tiene la capacidad de gelificar a temperatura ambiente; sin embargo, solo un 10% de la gelatina de pescado de aguas frías gelifica a -2 °C. Al ser geles termorreversibles, que funden a temperaturas menores de las del cuerpo humano, se produce el fenómeno de "derretido en boca" que es una propiedad valiosa para las industrias alimentaria y farmacéutica (Karayannakidis y Zotos, 2016; Lin et al., 2017).

Existen diferentes métodos para determinar las temperaturas de gelificación y fusión de los geles. Dos de las más utilizadas son la calorimetría diferencial de barrido y la prueba reológica conocida como análisis mecánico dinámico. En la primera, se definen las temperaturas como el pico máximo de temperatura durante la transición de enfriamiento (gelificación) y calentamiento (fusión). En la segunda, se definen como las temperaturas donde el módulo elástico (G') (relacionado con el comportamiento de los sólidos) y el módulo viscoso (G'') (relacionado con el comportamiento de los líquidos) son iguales, durante el enfriamiento (gelificación) y el calentamiento (fusión) (Díaz-Calderón et al., 2017; Karayannakidis y Zotos, 2016; Norziah et al., 2009; Sila et al., 2017).

3.3.2.1.2.1 Pruebas oscilatorias

Las pruebas oscilatorias se realizan utilizando el modelo de dos platos. El plato superior realiza el movimiento mecánico y el plato inferior es estacionario. La distancia entre los platos (h) y el área de contacto son conocidas. El movimiento oscilatorio del plato superior genera una fuerza de corte ($\pm F$), esta fuerza genera un patrón de deflexión ($\pm s$) y un ángulo de deflexión en la muestra ($\pm \varphi$) (Mezger, 2013) (ver figura 5).

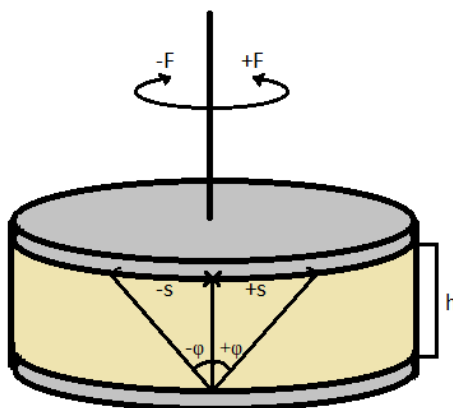


Figura 5. Esquema del modelo de 2 platos para la evaluación de pruebas oscilatorias.

Cuando se somete un esfuerzo de corte sobre la muestra (τ , Pa), se produce una tensión, deformación o fricción (γ , %) en el material. El comportamiento de estos dos parámetros respecto al tiempo, en una prueba oscilatoria, depende del comportamiento del material. Para los materiales que tienen un comportamiento elástico ideal (sólidos duros, rígidos e inflexibles), los valores máximos de τ y γ se dan en los extremos de la oscilación, y están en 0 cuando la oscilación pasa por el punto inicial de la prueba (desplazamiento 0) y, por lo tanto, el ángulo de cambio de fase (δ) es 0° . Para los materiales que tiene un comportamiento viscoso ideal, el valor máximo de τ se presenta en los extremos de la oscilación, donde la velocidad de giro es 0 y, por lo tanto, no se presentan fuerzas de fricción ($\gamma = 0$). Cuando la oscilación pasa por el punto inicial de la prueba (desplazamiento 0) se presenta un valor de $\tau=0$, una velocidad máxima de giro $\dot{\gamma}$, por lo tanto, un valor máximo de γ , para un δ de 90° (Mezger, 2013; Pértile et al., 2018). Los materiales viscoelásticos tienen un

comportamiento viscoso y elástico de manera simultánea, con δ entre 0° y 90° (ver Figura 6).

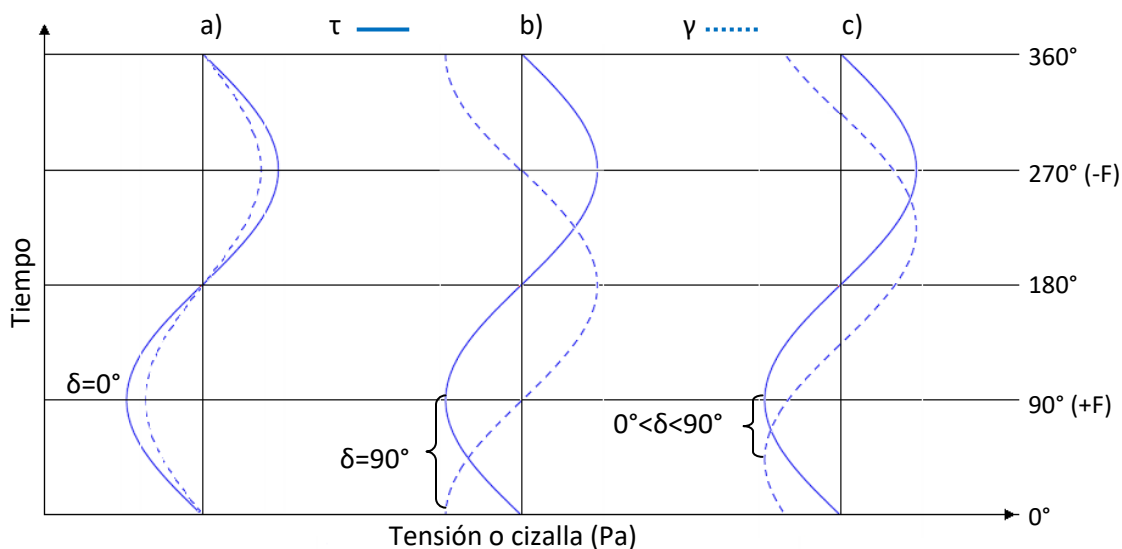


Figura 6. Relación de τ y γ respecto al tiempo y δ de acuerdo al comportamiento del material: a) elástico ideal, b) viscoso ideal y c) viscoelástico.

En las pruebas de oscilación se calcula el módulo complejo de cizalla (G^*) como la relación entre τ y γ . Representa un cálculo matemático complejo de la suma de una parte real, el módulo de almacenamiento o elástico (G'), relacionado con el comportamiento elástico capaz de almacenar energía, y una parte imaginaria, el módulo de pérdida o viscoso (G''), relacionado con el comportamiento viscoso y la disipación o pérdida de energía (ver Figura 7). Cuando predomina G' , el material se comporta principalmente como un sólido ($\delta < 45^\circ$) y cuando predomina el G'' , el material se comporta principalmente como un líquido ($\delta > 45^\circ$). Cuando G' y G'' son iguales se presenta el punto de fusión (transición de sólido a líquido) o el de gelificación (transición de líquido a sólido), justo cuando se presenta un $\delta = 45^\circ$ (Mezger, 2013; Pértile et al., 2018).

$$G^* = \frac{\tau(t)}{\gamma(t)} = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (1)$$

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (2)$$

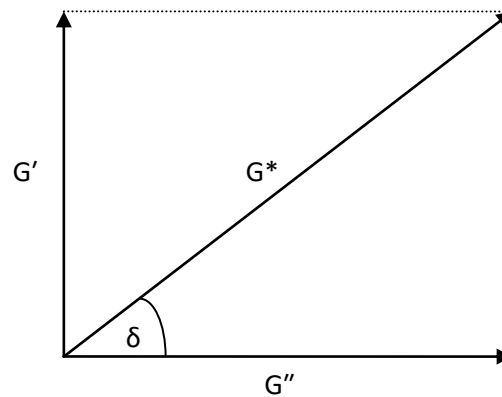


Figura 7. Diagrama vectorial de la relación entre G' , G'' y G^* .

3.3.2.2 Propiedades de superficie

Las cadenas de proteínas que conforman la gelatina tienen áreas hidrofílicas e hidrofóbicas, las cuales le confieren propiedades de actividad en las superficies, especialmente en la formación y estabilización de espumas y emulsiones. Estas características son aprovechadas por varias industrias, como la médica, farmacéutica y especialmente en la alimentaria. Entre las aplicaciones concretas que se pueden mencionar está la producción de malvaviscos, premezclas de café (por la estabilización de espumas) o mayonesas (como emulsificantes) (Karayannakidis y Zotos, 2016).

3.3.2.2.1 Capacidad emulsificante

Las proteínas y péptidos son compuestos de superficie activa que permiten la formación de emulsiones de aceite en agua, debido a sus grupos hidrófilos e hidrófobos. Según Pires y Batista (2013), las propiedades emulsionantes de los hidrolizados de proteínas de productos pesqueros están relacionadas con sus propiedades de superficie. Un requisito previo para la adsorción de una proteína en la interfaz aceite:agua es la presencia de zonas hidrófobas en la superficie de la molécula. Las propiedades emulsionantes de las proteínas (incluyendo la gelatina) están

influenciadas por el grado de hidrólisis, y generalmente disminuyen a medida que el grado de hidrólisis aumenta, debido a la formación de pequeños péptidos con menos actividad de la superficie y menos hidrofobicidad (Intarasirisawat et al., 2012; Kristinsson y Rasco, 2000). Las proteínas de pescado tienen varias capacidades emulsionantes que dependen de su composición, la hidrofobicidad y la longitud de cadena (Tahergorabi et al., 2011).

Liu et al. (2014) encontraron que las propiedades emulsionantes de los hidrolizados de subproductos de surimi, preparados con dos enzimas, disminuyeron con el aumento del grado de hidrólisis; por lo tanto, concluyen que el tamaño y el peso molecular de los hidrolizados son los factores más influyentes en sus propiedades emulsionantes. Según He et al. (2013), la capacidad emulsionante de diferentes hidrolizados de proteínas de subproductos marinos se comparó con otros emulsionantes comerciales de calidad alimentaria, como proteína de soya, proteína de caseína y de caseinato de sodio, encontrando que eran más eficaces. Esto indica el gran potencial de desarrollo de los hidrolizados de proteínas de subproductos marinos como agentes emulsionantes comerciales para formulaciones de alimentos.

En el caso específico de la gelatina de pescado, Surh et al. (2006) estudiaron el efecto del peso molecular y las condiciones ambientales (pH, contenido de sal y tratamiento térmico) sobre emulsiones de aceite en agua, determinando que se pueden preparar emulsiones con gelatinas de pesos moleculares altos y bajos, con concentraciones de 4% (m/v); sin embargo, son poco estables con contenidos altos de sal (> 250 mM NaCl), pH intermedios (3 - 8) y tratamientos térmicos moderados (30 °C a 90 °C por 30 min), limitando su uso como agente emulsificante. Ahmad y Benjakul (2011) encontraron que la gelatina de piel de *Aluterus monoceros* tiene menos capacidad de formación de emulsiones respecto a una gelatina comercial. Abdelmalek et al. (2016) determinaron que la gelatina de piel de calamar se puede utilizar en la industria alimentaria para mejorar las emulsiones.

3.3.2.2.2 Capacidad espumante

La espuma se compone de una fase continua acuosa y una fase dispersa gaseosa. En la mayoría de los productos alimenticios, las proteínas son los principales agentes de superficie activa que ayudan en la formación y estabilización de la espuma. Las proteínas de pescado con características anfífilas, es decir con las dos propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas, tiene las mejores propiedades espumantes (Tahergorabi et al., 2011).

Según Pires y Batista (2013) y Vazhiyil (2008), los hidrolizados de proteínas de pescado tienen buenas propiedades de formación y estabilización de espumas. Por lo que se pueden encontrar aplicaciones en soufflés y patés a base de pescado. Los factores que son relevantes para las propiedades espumantes son similares a las requeridas para la emulsión, la solubilidad, la viscosidad, el despliegue y la agregación de las superficies. La capacidad espumante de las proteínas de pescado es proporcionada por las proteínas solubles (proteínas hidrófilas), mientras que las proteínas desnaturalizadas restantes (proteínas hidrófobas) actúan como estabilizadores de la espuma (Tahergorabi et al., 2011).

Según Liu et al. (2014), el hidrolizado de subproductos de surimi con un grado de hidrólisis de 10 % exhibió las mejores propiedades de formación de espuma respecto a los hidrolizados con mayor grado de hidrólisis. También concluyó que a medida que aumentaba el grado de hidrólisis, las proteínas muestran una capacidad inferior de formación de espuma y menor estabilidad de la espuma. La misma tendencia encontraron (Intarasirisawat et al., 2012; Jemil et al., 2014; Klompong et al., 2007). Esta tendencia se puede explicar por las diferencias de la hidrofobicidad de la superficie, de tamaño y de carga de los péptidos.

Abdelmalek et al. (2016), Bougatef et al. (2012) y Sila et al. (2015) midieron la capacidad de formar espumas y de estabilizar espumas de gelatina obtenida de diferentes subproductos de pescado. Encontraron que estos dos parámetros mejoran

con el aumento de la concentración de gelatina en la solución, por el aumento en la viscosidad y el grosor de la película interfacial.

3.4 Tecnologías de membrana

Las tecnologías de membranas nacen en 1959 con la ósmosis inversa aplicada en la desalinización de agua; posteriormente se utilizaron en la concentración y fraccionamiento molecular por ultrafiltración o nanofiltración y para la separación macromolecular por microfiltración (Paulson et al., 1984). Se basan en la filtración, definida como la separación de dos o más componentes de un fluido primordialmente por diferencias de tamaño (Cheryan, 1998).

El fraccionamiento de los componentes se produce al emplear un gradiente, ya sea de presión o electrostático, para forzar el paso de una disolución a través de una membrana porosa semipermeable o no porosa, para que se obtenga una separación de sus componentes sobre la base del tamaño, e incluso de la carga molecular o la afinidad con la membrana, generando un retenido (fracción que no logra pasar por la membrana) y un permeado (fracción que logra pasar por la membrana) enriquecidos en el contenido de uno o más componentes (Chacón-Villalobos, 2006; Cheryan, 1998; Girard et al., 2000).

Las membranas utilizadas en estas tecnologías son de una gran diversidad de materiales y de formas (planas, espirales, tubulares y fibras huecas). En términos del material de fabricación, las membranas pueden estar hechas de acetato de celulosa (celulósicas), de polímeros orgánicos (polisulfonas, teflón, propilenos, poliamidas, polisulfuros, polipropilenos), o compuestas de sales inorgánicas (ZrO_2 , Al_2O_3 , TiO_2) (Vaillant et al., 2004). En el Cuadro V se observa una comparación de las principales características de las diferentes configuraciones de las membranas.

De acuerdo con D'Souza y Mawson (2005), las tecnologías de separación por membrana han capturado la atención de la industria de alimentos desde su

introducción en 1960, ya que proveen la oportunidad única de fraccionar y concentrar componentes en sistemas líquidos sin recurrir a cambios de fases, reteniendo características físicas y químicas de componentes claves en los alimentos. Según Girard et al. (2000), los procesos de membrana son energéticamente eficientes (respecto a otros procesos de concentración) debido a que no está involucrado un cambio de fase en la remoción del agua. Esto elimina la intensiva necesidad de equipos de transferencia y generación de calor, condensadores y sus problemas asociados.

Cuadro VI. Características generales de diferentes configuraciones de membrana.

Configuración	Densidad de empaque (m²/m³)	Costo energético (bombeo)	Bloqueo por partículas	Facilidad de limpieza	Volumen muerto
<i>Planas</i>	300	Moderado	Moderado	Buena	Bajo
<i>Tubulares</i>	60	Alto	Bajo	Excelente	Alto
<i>Fibras huecas</i>	1200	Bajo	Alto	Pobre	Bajo
<i>Espirales</i>	600	Bajo	Muy alto	Moderada	Bajo

Fuente: Bhattacharjee et al. (2017)

Cuperus y Nijhuis (1993) indican que las ventajas del uso de las tecnologías de membranas en la industria de alimentos son su capacidad de separar moléculas, bacterias y macromoléculas, la reducción del daño térmico de los compuestos de interés y el moderado consumo de energía. Saidi et al. (2014) mencionan que, comparadas con otros métodos de separación como la cromatografía en gel, las tecnologías de membrana ofrecen muchas ventajas, como una mayor productividad, menor capital de inversión, mayor concentración y mantenimiento de la calidad del producto en condiciones ambientales, mayor facilidad de escalamiento y el equipo es más fácil de limpiar.

3.4.1 Tipos de tecnología de membrana

Existen diferentes tecnologías de membranas que se pueden utilizar para separar y concentrar componentes valiosos de los subproductos de la industria pesquera, entre

las cuales destacan (por estar establecidas en diferentes industrias) la microfiltración, la ultrafiltración, la nanofiltración y la ósmosis inversa (OI) (Tewari, 2015). Según Chacón-Villalobos (2006) y Ionics Inc (2004), estas tecnologías se diferencian por el tipo de membranas que utilizan, su tamaño de poro o punto de corte, su presión de operación y por los diferentes componentes que pueden retener.

3.4.1.1 Ósmosis inversa

Según Girard et al. (2000), es el proceso mediante el cual se pueden concentrar sales y otros compuestos de mayor tamaño (ver Figura 8) sin necesidad de aplicar altas temperaturas. La fuerza motriz de este proceso es la presión hidráulica, la cual debe superar a la presión osmótica para transportar, a través de una membrana semipermeable, el agua desde un sitio de concentración alta a otro de concentración baja. La membrana polimérica es no porosa, y la alta presión hidráulica de la alimentación disuelve las moléculas de agua en la membrana, pasando por los espacios entre las cadenas poliméricas hasta el lado del permeado (Yoon, 2015). La ósmosis inversa típicamente es usada para la desalinización de agua de mar, opera a temperatura ambiente y consume menos energía respecto al proceso convencional de destilación (Tewari, 2015).

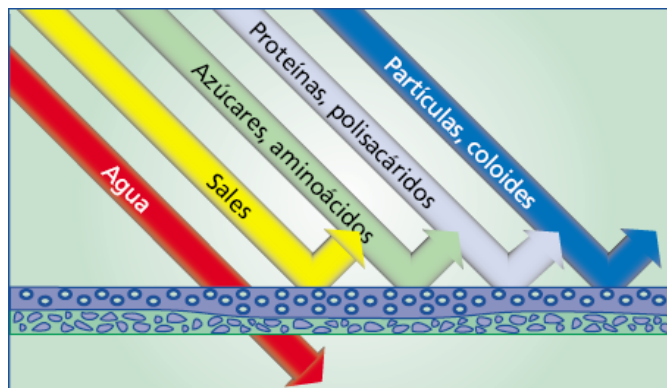


Figura 8. Componentes retenidos por la membrana en la OI. Fuente: GEA (2007).

3.4.1.2 Nanofiltración

Es una técnica intermedia entre la ultrafiltración y la osmosis inversa, que también se describe como una tecnología de osmosis inversa gruesa. La membrana presenta un tamaño de poro promedio de $0,001 \mu\text{m}$, puede separar los componentes por tamaño, pero su principal mecanismo de separación es la exclusión por carga (Yoon, 2015). La fuerza motriz es la presión hidráulica y puede separar desde aminoácidos, colorantes y azúcares, hasta sales divalentes y otros componentes de pesos moleculares mayores a los 1000 Da (Tewari, 2015).

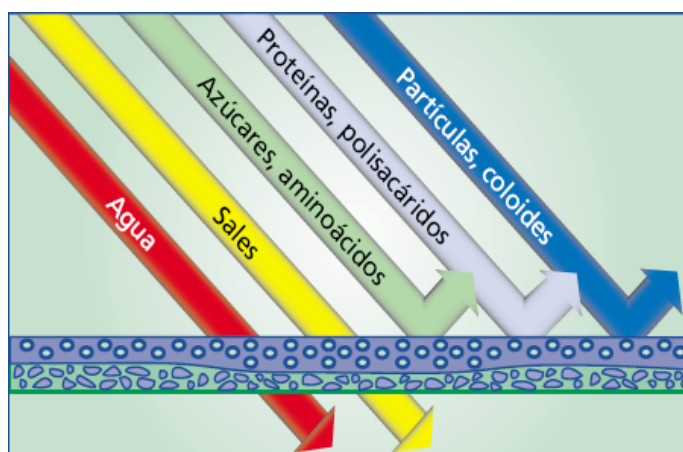


Figura 9. Componentes retenidos por la membrana en la NF. Fuente: GEA (2007).

3.4.1.3 Ultrafiltración

La ultrafiltración es un proceso de separación y concentración selectivo que usa presiones altas como fuerza motriz (de 2 a 10 bar), el tamaño de poro va de los $0,02 \mu\text{m}$ hasta los $0,1 \mu\text{m}$ y es capaz de retener moléculas entre los 300 y los 500 000 Da, como los polisacáridos y las proteínas (Tewari, 2015). La ultrafiltración es usada en el fraccionamiento de la leche y el suero, y en el fraccionamiento de proteínas (Cheryan, 1998).

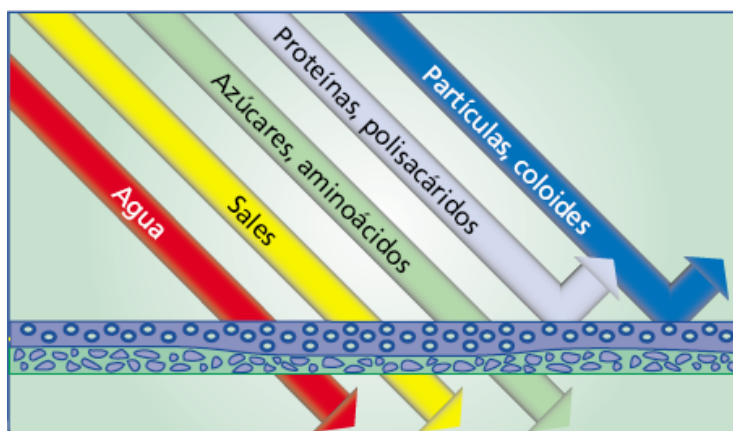


Figura 10. Componentes retenidos por la membrana en la UF. Fuente: GEA (2007).

3.4.1.4 Microfiltración

La microfiltración es similar a la UF, pero la diferencia está en el tamaño de poro (0,1 μm a 10 μm , reteniendo coloides y sólidos insolubles) y en la presión utilizada (0,5 bar a 3 bar) como fuerza motriz (Cheryan, 1998; Tewari, 2015). Puede separar macromoléculas y sólidos suspendidos; se utiliza principalmente para la fermentación, la clarificación de jugos y la clarificación y recuperación de biomasa (Cheryan, 1998). Tewari (2015) indica que la microfiltración tiene una amplia gama de aplicaciones en la industria alimentaria y química, pero tiene un gran potencial en el campo de la biotecnología y del tratamiento de residuos líquidos.

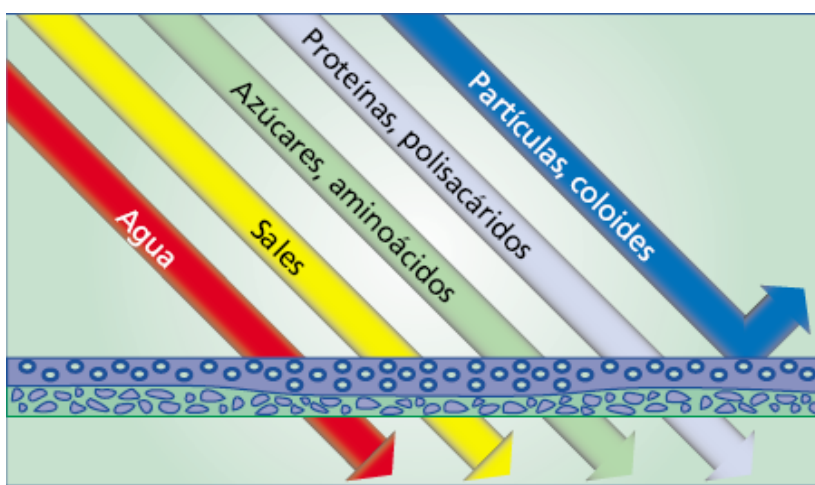


Figura 11. Componentes retenidos por la membrana en la MF. Fuente: GEA (2007).

3.4.2 Factores que afectan la eficiencia y productividad de las tecnologías de membrana

La eficiencia y efectividad de los procesos de membrana se definen en términos de flujo de permeado (J_p) y del factor de reducción volumétrico (FRV) (Hodúr et al., 2009).

El J_p se define como el volumen de permeado (V_p) que pasa por la membrana en un periodo de tiempo determinado (t) respecto al área de la membrana (A_m), como se expresa en la ecuación 3. Se suele expresar en términos de $L/(h \cdot m^2)$. En los procesos membranarios se busca que este flujo sea el mayor posible; sin embargo, tiende a disminuir por el efecto de la colmatación o saturación de la membrana.

$$J_p = \frac{V_p}{A_m \times t} \quad (3)$$

El FRV se define como la relación existente entre el volumen total alimentado al sistema (V_a) y el volumen total retenido (V_r), como se indica en la ecuación 4 (Hodúr et al., 2009; Vaillant et al., 2004), donde V_p representa el volumen de permeado.

$$FRV = \frac{V_a}{V_r} = \frac{(V_p + V_r)}{V_r} \quad (4)$$

El FRV, por lo general, es inversamente proporcional al flujo de permeado, ya que conforme el tiempo pasa el volumen alimentado aumenta, con lo que se incrementa la concentración de sólidos dentro del sistema, los cuales contribuyen al decrecimiento del flujo de permeado por el aumento del colmataje de la membrana, el bloqueo de los poros y el incremento de la viscosidad de la matriz (Carneiro et al., 2002). El FRV es un indicador de la viabilidad industrial del proceso, ya que permite estimar el rendimiento del retenido y del permeado (Vaillant et al., 2001), como se muestra en la ecuación 5.

$$Rendimiento = \frac{V_p}{V_a} = 1 - \frac{1}{FRV} \quad (5)$$

En la práctica industrial se desea que los procesos sean continuos y que las condiciones operacionales sean constantes a lo largo del tiempo. En las tecnologías de membrana, para mantener el J_p constante, se deben mantener los parámetros operacionales y el FRV constante, por lo que es necesario remover determinada cantidad de retenido en intervalos regulares de tiempo; según (Vaillant et al., 2001), el valor de flujo de retenido (J_r) se obtiene con la siguiente ecuación:

$$J_r = \frac{J_p}{FRV-1} \quad (6)$$

Por lo tanto, se deben desarrollar estrategias para las instalaciones industriales balanceando los costos operacionales y seleccionando un valor de FRV que minimice los costos de producción y maximice los beneficios en términos de la cantidad de permeado o concentrado, según sea el objetivo en cada caso. Diná Afonso et al. (2004) indican que las pruebas preliminares son esenciales ya que permiten identificar las condiciones de funcionamiento adecuadas, que determinarán el tipo de membrana y las bombas requeridas por el proceso, dos factores fundamentales en el costo de la inversión.

El J_p y el FRV, principales parámetros de productividad, dependen de muchos factores, Yoon (2015), indica que los más influyentes son el tamaño de los poros, la presión transmembranaria (P_{tm}) y la velocidad tangencial (U).

3.4.2.1 Punto de corte o diámetro del poro

Las membranas de MF y UF son porosas, por lo que retienen las partículas con tamaños superiores a los diámetros de sus poros. En términos generales, se presentarán mayores flujos de permeado y se retendrán partículas de mayor tamaño, al aumentar el tamaño de los poros. Sin embargo, se debe considerar que las partículas o moléculas que son retenidas por la membrana tienden a formar una capa en su superficie, conocida como capa de colmatado, que suele tener una mayor resistencia

al flujo y al paso de partículas que la membrana misma, por lo que se debe tomar en cuenta este factor para elegir la membrana que se va a utilizar en cada caso.

3.4.2.2 Velocidad tangencial

Es la velocidad lineal promedio del fluido que circula por la membrana, del lado del retenido (Cheryan, 1998). El adjetivo “tangencial” se refiere a la dirección del flujo de alimentación respecto a la membrana, en este caso es en paralelo (ver Figura 12), a diferencia de la filtración tradicional en donde el flujo de alimentación es perpendicular a la superficie de la membrana filtrante.

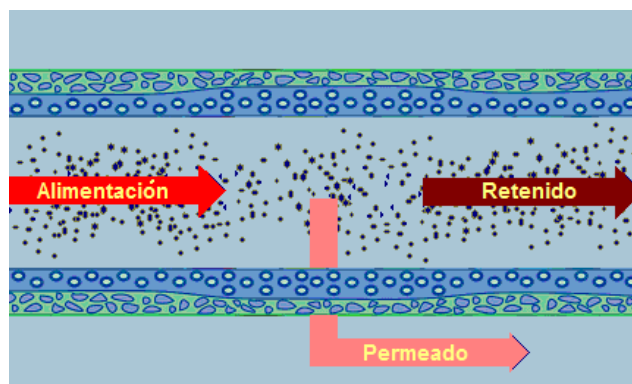


Figura 12. Principio de filtración tangencial. Fuente GEA (2007).

Según Cozzano (2007), este flujo tangencial a la superficie de la membrana presenta una acción de arrastre o barrido que reduce la formación de un depósito de solutos sobre la membrana, lográndose un índice de filtración más alto, aumentando el rendimiento del proceso. Por lo tanto, a mayor U se presentará mayor turbulencia que causa un mayor cizallamiento contra la membrana, por ende, una menor acumulación de materiales sobre ella y un mayor flujo de permeado. Para el procesamiento, U es limitada por la capacidad y costo de las bombas y el costo energético de operación (Vaillant et al., 2004).

3.4.2.3 Temperatura

La temperatura tiene un efecto directo sobre el flujo de permeado, esto se da porque los líquidos disminuyen su viscosidad con el aumento de la temperatura (Cheryan, 1998). El límite máximo de temperatura a utilizar en cada aplicación estará determinado por el efecto que cause en la calidad nutricional, funcional y sensorial del producto final (Vaillant et al., 2004) y en la resistencia térmica del equipo y del material de las membranas utilizadas.

3.4.2.4 Presión transmembranaria

En la mayoría de las membranas el paso del permeado; por los poros no ocurre de manera espontánea, ya que necesita que se aplique una fuerza para poder vencer la resistencia que genera la capa filtrante. En estas tecnologías la principal fuerza motriz es la P_{tm} , la cual se define como la diferencia de presiones entre ambos lados de la membrana. En términos generales se espera que a mayor P_{tm} se presenten mayores flujos de permeado; sin embargo, esto es cierto en un rango de presiones, ya que si la presión se aumenta en exceso se producirá una capa de colmatado muy densa sobre la membrana, limitando el flujo de permeado y provocando un colmataje excesivo de la membrana (Yoon, 2015).

3.5 Recuperación de compuestos proteicos utilizando tecnologías de membrana

Los procesos de separación de membrana se utilizan para el fraccionamiento de moléculas de alto valor de subproductos proteicos hidrolizados con el objetivo de mejorar sus propiedades funcionales (Saidi et al., 2014). Aplicaciones de membranas en la industria pesquera surgieron en la década de los años 80, pero el número de estudios publicados han mostrado un aumento significativo en los últimos años. Las aplicaciones abarcan el tratamiento de aguas residuales, la recuperación de las proteínas, la producción de concentrados de proteína de pescado e hidrolizados y la

recuperación de compuestos bioquímicos de materias primas marinas (Diná Afonso et al., 2004). Como se mencionó anteriormente, la mayor parte de las aplicaciones de las tecnologías de membranas se basa en el fraccionamiento y concentración de los compuestos de interés; sin embargo, para llegar a esta etapa se pueden requerir pretratamientos, utilizando tecnologías de membranas o, en el caso de la obtención de proteínas y péptidos, la hidrólisis química o enzimática.

Según Patras et al. (2011), una de las opciones técnicas para la extracción y el fraccionamiento de compuestos valiosos es la aplicación de tecnologías de membranas. Por ejemplo, Diná Afonso et al. (2004) indican que el contenido de proteína en los efluentes de la industria pesquera es de 0,5 a 20 g/L, contenido muy bajo para recuperarlo por métodos convencionales como la evaporación o el secado por aspersión, por lo que la utilización de las tecnologías de membranas, en particular la ultrafiltración y la nanofiltración, es una excelente opción. El proceso general para la producción de compuestos proteicos a partir de subproductos pesqueros, utilizando tecnologías de membrana se muestra en la Figura 13.

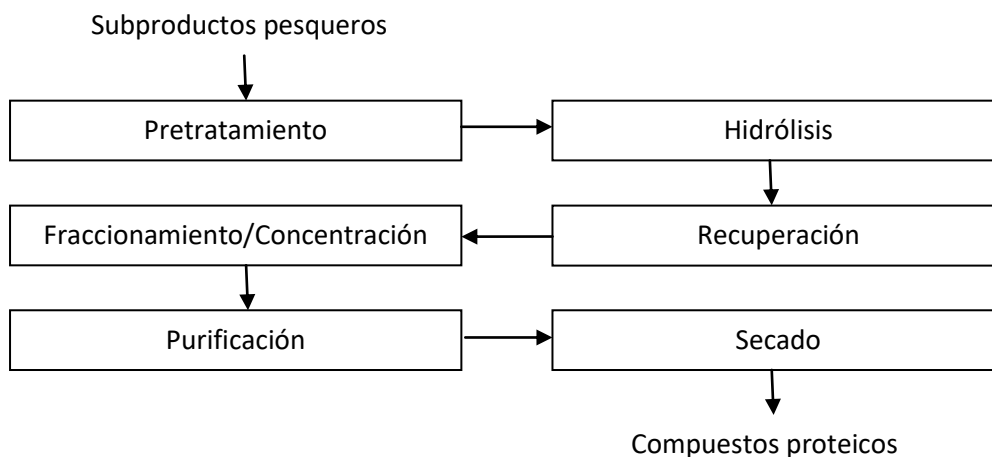


Figura 13. Proceso general para la obtención de compuestos proteicos funcionales a partir de subproductos de la industria pesquera.

3.5.1 Pretratamientos

Según He et al. (2013), el propósito de la etapa de pretratamiento es preparar una mezcla de subproducto picado y agua con un bajo contenido de grasa, para utilizarlo de sustrato y medio para las etapas posteriores, especialmente para la hidrólisis. El contenido de grasa de los hidrolizados de proteínas de pescado debe ser adecuadamente controlado. La FAO establece como estándar que el contenido de grasa de hidrolizados de proteínas de pescado para el consumo humano debe estar por debajo de 0,5% (m/m). Un mayor contenido de grasa oscurece los productos finales, debido a la liberación de los pigmentos marrones de la oxidación de los lípidos (Kristinsson y Rasco, 2000).

Por ejemplo, en la industria atunera, los subproductos se trituran con agua potable (relación másica 1:2) en una picadora de carne durante 5 minutos (Chakrabarti, 2005). Klompong et al. (2007) hidrolizaron proteínas de jurel de raya amarilla (*Selaroides leptolepis*), donde se picaron los subproductos y se mezclaron con agua destilada. Liu, et al. (2014) trabajaron con subproductos del proceso de surimi con pretratamientos más complejos que incluyen el desengrasado con isopropanol (relación masa:volumen 1:5) durante 1 h a 30 °C, un filtrado para recuperar los sobrenadantes, el secado del material desengrasado a temperatura ambiente, para posteriormente suspender el material en agua destilada (3% m/v) y homogeneizarlo a una velocidad de 10 000 rpm durante 1 min. Similar pretratamiento utilizaron Chi et al. (2014) desengrasando la materia prima con isopropanol.

Las tecnologías de membrana con poros de tamaño superior (MF) se pueden utilizar como pretratamiento de otras operaciones de fraccionamiento y concentración para la obtención de productos funcionales de origen proteico de los subproductos de la industria pesquera. Específicamente para afinar los líquidos a fraccionar eliminando partículas grandes como sólidos suspendidos, glóbulos de grasa, o bacterias para prevenir el deterioro de estas matrices o el colmataje excesivo de las membranas en

las posteriores etapas de fraccionamiento y concentración por UF o NF. Por ejemplo, Diná Afonso et al. (2004) utilizaron una membrana de MF de 5 μm como pretratamiento de las operaciones de UF y NF, encontrando que es eficiente para eliminar la fracción de aceite y grasa de los efluentes de la industria pesquera que de otro modo podrían adsorberse sobre las membranas de UF / NF produciendo una caída de los flujos de permeado por el colmataje de las membranas.

3.5.2 Hidrólisis enzimática

Otro tratamiento que se suele utilizar para la valorización de subproductos de la industria pesquera, antes del fraccionamiento y concentración utilizando tecnologías de membranas, es la hidrólisis enzimática. Según Chakrabarti (2005), se ha encontrado que el uso de enzimas proteolíticas es un método factible para extraer fácilmente proteínas a partir de pescado subutilizado o sus subproductos. La operación consiste en la hidrólisis de enlaces peptídicos por parte de enzimas. Las enzimas proteolíticas pueden ser endógenas o de otras fuentes, tales como animales (de tripsina o de pancreatina), plantas (papaína, bromelina o ficina) y microorganismos (pronasa o alcalasa) (Herpandi et al., 2011; López-Caballero et al., 2013).

En general, el método de producción de hidrolizados de proteínas de los subproductos pesqueros implica la mezcla de subproductos picados con enzimas y la incubación en un reactor durante un tiempo definido o hasta alcanzar el grado de hidrólisis requerido en condiciones óptimas para la actividad de la enzima, seguido de la inactivación de enzimas por calentamiento o ajuste del pH (Suresh y Prabhu, 2012).

El perfil peptídico del producto final se ve afectado no sólo por la especificidad de las enzimas, sino también por las condiciones del proceso (tales como la temperatura y el pH), que afectan en gran medida la cinética de la reacción de las enzimas (Herpandi et al., 2011).

Las enzimas con un pH de trabajo óptimo en el intervalo ácido, como la pepsina, son preferidas ya que el bajo pH puede inhibir el crecimiento de microorganismos. Sin embargo, el ambiente de pH ácido también conduce a una baja recuperación de proteínas, a valores nutricionales bajos debido a la destrucción del aminoácido esencial triptófano, y a niveles bajos de funcionabilidad por el exceso de hidrólisis (Kristinsson y Rasco, 2000). En el Cuadro VI se observan las enzimas y las condiciones de proceso utilizadas por diferentes autores para la hidrólisis de subproductos de mariscos y pescado.

Cuadro VII. Enzimas y condiciones de proceso para la hidrólisis de diferentes subproductos de la industria pesquera

Subproducto	Enzima	Concentración	Condiciones de proceso			Fuente
			pH	Temperatura	Tiempo o grado de hidrólisis	
Camarón	Fermentación láctica	n.d.	n.d.	30 °C	36 h	Bueno-Solano et al. (2009)
Jurel de raya amarilla (<i>S. leptolepis</i>)	Alcalasa Flavourzyme	0,24% a 10%	8,5 7,0	60 °C 50 °C	5%, 15% y 25%	Klompong et al. (2007)
Atún	Alcalasa Papaína	0,5%	8,0- 8,5 6,0- 7,0	50-55 °C	60 min	Thankappan et al. (1998)
Bacalao	Proteinasa de atún	n.d.	10	50 °C	12 h	Jeon et al. (1999)
Surimi	Alcalasa Protamex	3000 U/g 2400 U/g	8,5 7,0	60 °C 50 °C	10%, 20% y 30%	Liu et al. (2014)
Sable negro (<i>Aphanopus carbo</i>)	Protamex	0,5% a 4%	7,5	50 °C	2 h	Batista et al. (2010)
Ostras (<i>Crassostrea talienwhanensis</i>)	Subtilisina	1,8%	6,0	65 °C	70 min	Wang et al. (2014)
Macarela india (<i>Rastrelliger kanagurta</i>)	Pepsina Papaina	1,0%	2,0 6,0	37 °C	6 h	Sheriff et al. (2014)
Sardina (<i>Sardinella aurita</i>) Pez cebra "blenny" (<i>Salarias basilisca</i>) Pez gobio (<i>Zosterisessor ophiocephalus</i>) Raya (<i>Dasyatis pastinaca</i>)	Fermentación con <i>Basillus subtilis</i>	n.d.	8,0	37 °C	24 h	Jemil et al. (2014)
Rape (<i>Lophius litulon</i>)	Pepsina	2%	8,0	40 °C	4 h	Chi et al. (2014)

n.d.: No definida

Cuadro VI (continuación). Enzimas y condiciones de proceso para la hidrólisis de diferentes subproductos de la industria pesquera.

Subproducto	Enzima	Concentración	Condiciones de proceso			Fuente
			pH	Temperatura	Tiempo o grado de hidrólisis	
Salmón	Alcalasa	1%	7,0	50 °C	8 h	Ahn et al. (2012)
	Flavourzyme		7,0	50 °C		
	Neutrased		7,0	50 °C		
	Pepsina		2,0	37 °C		
	Protamex		7,0	50 °C		
	Tripsina		7,0	37 °C		
Atún (carne oscura)	Alcalasa	30 g/L	8,5	55 °C	1 h	Saidi et al. (2013)
Bacalao del pacífico	Flavourzyme	1%	n.d.	50 °C	1 h	Korzeniowska et al. (2013)
Salmón (<i>Salmo salar</i>)	Tripsina y Quimotripsina	10000 U/g	7,8	37 °C	4 h	Girgih et al. (2013)
Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Properasa E	5%	9,0	55 °C	4,5 h	Zhang et al. (2012)
	Multifec Neutral	5%	8,0	35 °C	4,5 h	
Anguila	Alcalasa	48 U/kg	9,0	60 °C	2 h	Yanan et al. (2012)
	Papaina		6,5	65 °C		
Atún (huevas)	Alcalasa	1% 5%	8,0	50 °C	5 h	Intarasirisawat et al. (2012)
Sardina	Alcalasa Concentrado de vísceras Concentrado de subproductos	25%	n.d.	30 °C	312 min	Castro-Ceseña et al. (2012)
Carpa plateada (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	Alcalasa	5%	7,0	50 °C	20%	Zhong et al. (2011)
	Flavourzyme		7,0	50 °C		
	Neutrased		8,0	50 °C		
	Papaina		7,0	37 °C		
	Pepsina		2,0	37 °C		
	Protamex		7,0	50 °C		
Tripsina	8,0	37 °C				
Corvina amarilla (<i>Pseudosciaena crocea</i>)	Alcalasa	2%	9,5	50 °C	4 h	Chi et al. (2015)
	Papaina	1%	7,0	50 °C		
Raya (<i>Raja clavata</i>)	Alcalasa	3 U/mg	8,0	50 °C	400 min	Lassoued et al. (2015)
	Neutrased		7,0	50 °C		
	Proteasa de <i>B. subtilis</i> A26		8,0	40 °C		
	Proteasa alcalina de <i>R. clavata</i>		8,0	40 °C		

n.d. No definida

3.5.3 Recuperación

Posterior al proceso de hidrólisis se genera una dispersión donde están presentes los hidrolizados proteicos y los péptidos, una fracción lipídica (si no se desengrasó el

subproducto anteriormente) y otros sólidos suspendidos. Estas fracciones se separan generalmente por centrifugación porque poseen diferentes densidades. En el Cuadro VII se observan condiciones de separación utilizadas para la recuperación de hidrolizados en diferentes investigaciones.

Cuadro VIII. Condiciones de centrifugación para la recuperación de hidrolizados de subproductos de la industria pesquera

Subproducto	Fuerza o velocidad de centrifugación	Tiempo	Temperatura	Fuente
Camarón	1250 rpm	15 min	5 °C	Bueno-Solano et al. (2009)
Jurel de raya amarilla (<i>S. leptolepis</i>)	2000 g	20 min	n.d.	Klompong et al. (2007)
Surimi	10000 rpm	15 min	4 °C	Liu et al. (2014)
Sable negro (<i>A. carbo</i>)	9800 g	30 min	n.d.	Batista et al. (2010)
Ostras (<i>C. talienwhanensis</i>)	3000 g	25 min	Ambiente	Wang et al. (2014)
Arenque	6450 g	10 min	70 °C	Šližytė et al. (2014)
Macarela india (<i>R. kanagurta</i>)	10000 rpm	15 min	n.d.	Sheriff et al. (2014)
Sardina (<i>S. aurita</i>) Pez cebra "blenny" (<i>S. basilisca</i>) Pez gobio (<i>Z. ophiocephalus</i>) Raya (<i>D. pastinaca</i>)	8500 g	30 min	4 °C	Jemil et al. (2014)
Salmón (<i>S. salar</i>)	5200 g	30 min	4 °C	Girgih et al. (2013)
Huevas (<i>Labeo rohita</i> y <i>Channa striatus</i>)	2236 g	30 min	n.d.	Galla et al. (2012)
Sardina	15000 g	15 min	4 °C	Castro-Ceseña et al., (2012)
Corvina amarilla (<i>P. crocea</i>)	5000 g	15 min	n.d.	Chi et al. (2015)
Raya (<i>R. clavata</i>)	5000 g	20 min	n.d.	Lassoued et al. (2015)

n.d. No definida

3.5.4 Fraccionamiento y concentración

Según Bougatef et al. (2010), el fraccionamiento de los subproductos de pescado se realiza principalmente utilizando tecnología de membranas después de la eliminación de la grasa y la centrifugación y antes de la liofilización. Técnicas de separación de membrana como la microfiltración, nanofiltración, ultrafiltración y la filtración con

electro-membrana proporcionan una tecnología potencial para la industria al elaborar productos enriquecidos de proteínas y péptidos pesqueros de pesos moleculares específicos (Bourseau et al., 2009; Cardoso y Nunes, 2013).

Según Kim y Mendis (2006), uno de los factores más importantes en la producción de péptidos bioactivos, con propiedades funcionales deseadas, es su peso molecular. Por lo tanto, para la recuperación eficiente y la obtención de péptidos de un tamaño molecular y propiedades funcionales deseadas es fundamental la selección correcta de las membranas de UF o NF a utilizar. En el Cuadro VIII se observan los puntos de corte utilizados para fraccionar proteínas y péptidos en diferentes investigaciones.

Cuadro IX. Punto de corte de membranas de UF para el fraccionamiento de hidrolizados de proteínas de origen marino.

Subproducto	Punto de corte	Fuente
Bacalao	30, 10, 5 y 3 kDa	Jeon et al. (1999)
Abadejo de Alaska	30, 10, 5, 3 y 1 kDa	Je et al. (2005)
Ostras (<i>Crassostrea talienwhanensis</i>)	3 kDa	Wang et al. (2014)
Cangrejo de nieve	1 kDa	Suwal et al. (2014)
Cangrejo de nieve	50 y 1 kDa	Beaulieu et al. (2009)
Bacalao	5 y 3 kDa	Sabeena Farvin et al. (2014)
Rape (<i>Lophius litulon</i>)	3 y 1 kDa	Chi et al. (2014)
Atún (carne oscura)	10, 8,5, 5, 3,5 y 1 kDa	Saidi et al. (2013)
Atún (carne oscura)	4 y 1 kDa	Saidi et al. (2014)
Atún (<i>Katsuwonus pelamis</i>)	3 kDa	Intarasirisawat et al. (2013)
Atún (esqueleto)	10, 5 y 1kDa	Lee et al. (2010b)
Salmón (<i>Salmo salar</i>)	1 kDa	Girgih et al. (2013)
Cangrejo roca (<i>Cancer irroratus</i>)	1 kDa	Beaulieu et al. (2013)
Calamar	10, 6 y 2 kDa	Lin et al. (2012)
Sardina	0,05 μ m	Benhabileset al. (2012)
Carpa plateada (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	10, 5, 3 y 1 kDa	Zhong et al. (2011)
Camarón (<i>Pandalus borealis</i>)	5 y 1 kDa	Gildberg et al. (2011)
Macarela	15 y 1 kDa	Diná Afonso et al. (2004)

3.5.5 Purificación

Los métodos más comunes utilizados para la purificación de péptidos y proteínas incluyen la UF, ya que permite el trabajo en un período continuo, lo que lo hace un procedimiento con menores costos de operación y fácil de ampliar por su carácter modular (Lafarga y Hayes, 2014). Sin embargo, para purificar péptidos específicos, los procesos membranarios pueden necesitar ser acoplados con las técnicas cromatográficas.

Algunos estudios de purificación utilizan la cromatografía en gel, después del fraccionamiento por membranas, para obtener fragmentos de péptidos puros con los más altos niveles de bioactividad (Chi et al., 2014; Hou et al., 2012; Huang et al., 2012; Wang et al., 2014). Ahn et al. (2014), Chi et al. (2014), Girgih et al. (2013), Hou et al. (2012), Huang et al. (2012) y Zhang et al. (2012) también utilizaron cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) para la purificación de los péptidos. Otra opción que se ha empleado para separar péptidos es la utilización de la electro-diálisis, tecnología membranaria que permite separar y concentrar los péptidos por su tamaño y carga. Por ejemplo, Suwal et al. (2014) y Shi et al. (2010) la utilizaron en la separación de péptidos hidrolizados de subproductos de pescado.

Otra posibilidad para purificar las fracciones retenidas por las diferentes membranas es la diafiltración, que consiste en mezclar los retenidos con agua y filtrar de nuevo, consiguiendo un lavado de los componentes que pueden pasar por la membrana pero que siguen en la matriz del retenido, con lo que se pueden eliminar aminoácidos, sales y compuestos volátiles que pueden afectar la calidad sensorial o funcional de las diferentes fracciones.

3.3.6 Secado

Aunque existen estudios que evalúan la funcionabilidad de las proteínas hidrolizadas en solución (Batista et al., 2010; Bueno-Solano et al., 2009), las formas líquidas de

hidrolizados de proteínas de pescado pueden descomponerse rápidamente, debido al alto contenido de agua y la facilidad con la que las bacterias utilizan las proteínas como sustratos (He et al., 2013). Por lo anterior, usualmente los hidrolizados de proteínas extraídos de subproductos pesqueros se secan y muelen hasta obtener un polvo estable. Esto agrega otras ventajas, ya que el producto es más ligero y más fácil de transportar que la forma líquida y puede ser almacenado durante períodos de tiempo más largos.

En pequeña escala la deshidratación se suele hacer por secado al vacío (Bueno-Solano et al., 2009; Thankappan et al., 1998) o liofilización (Ahn et al., 2014; Ben Khaled et al., 2012; Jemil et al., 2014; Klompong et al., 2007; Liu et al., 2014; Šližytė et al., 2014). Según He et al. (2013), se puede predecir que si la producción se escala desde el laboratorio a la industria, el secado se realizará por atomización. El producto final de hidrolizados de proteínas es de color blanco cremoso, con buena solubilidad en agua y con diferentes funciones tecnológicas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización del proyecto

La evaluación del pretratamiento ácido y del proceso de extracción de proteínas, a nivel de laboratorio, y la definición del tratamiento enzimático se realizó en el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos. El escalamiento de la extracción, a nivel de planta piloto, así como los ensayos de fraccionamiento con diferentes tecnologías de membranas para obtener proteínas con diferentes pesos moleculares y características funcionales se realizaron en un anexo de la Planta Piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), exclusivo para estos procesos.

Los análisis del tamaño de las proteínas se realizaron en el Instituto Clodomiro Picado. La caracterización reológica de las proteínas se realizó en el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot). Los otros análisis físicos y químicos se realizaron en los Laboratorios de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos y del CITA.

4.2 Materia prima

Se utilizó la piel de atún, un subproducto obtenido en la elaboración de atún fresco en lomo (ver Figura 14). Se trabajó con piel de atún de la especie *Thunnus albacares*, conocida como aleta amarilla. Los atunes fueron capturados en las costas costarricenses del océano pacífico. La piel se separó de los lomos en la etapa de extracción de piel (ver Figura 14) y fue donada por la empresa Tunatun S.A., ubicada en el Coyol de Alajuela, Costa Rica. Actualmente, la piel representa entre un 21 y 22% de la materia prima inicial (atún eviscerado) y, junto con las espinas, se donan a otra empresa para la elaboración de harina de pescado para alimentación animal.

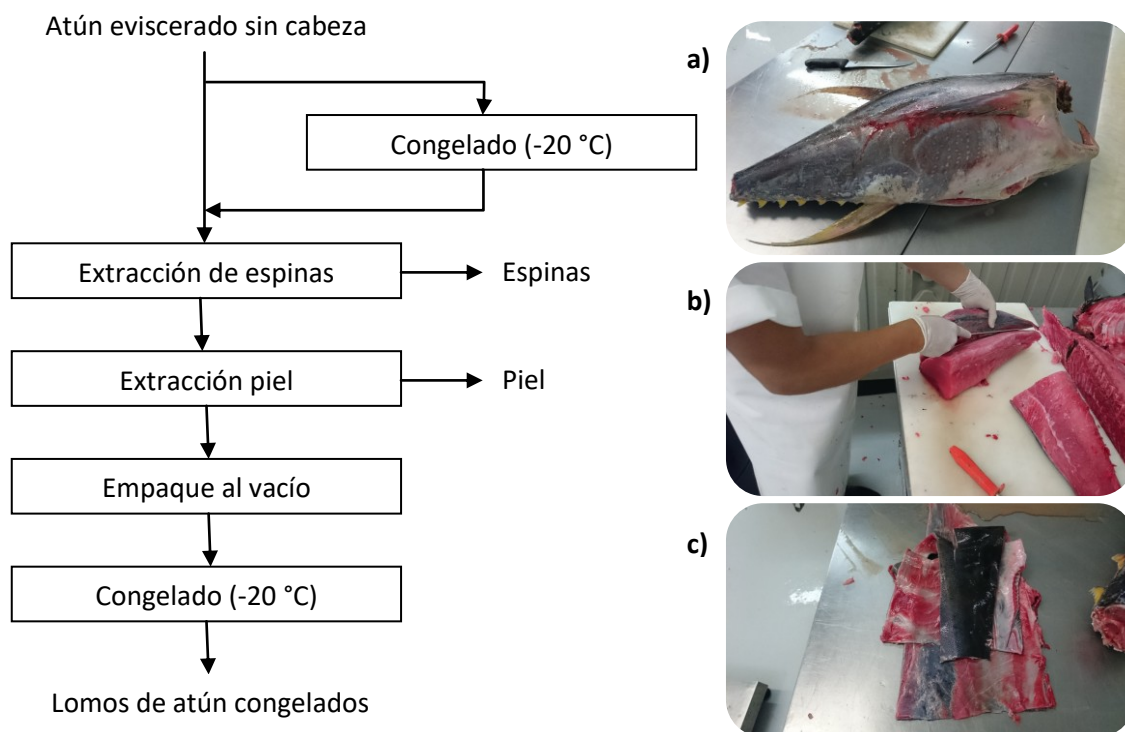


Figura 14. Flujo de proceso de elaboración de lomos de atún fresco en la empresa Tunatun S.A. Fotografías: a) atún descongelado; b) extracción de los lomos, y c) pieles de atún.

4.2.1 Tamaño de lote y condiciones de almacenamiento

Se utilizó un lote de 76 kg, con piel de atún producida en 2 días distintos (aproximadamente 38 kg de piel de atún de cada día). La piel se transportó a la Planta Piloto del CITA en hieleras con hielo en escarcha, inmediatamente se picaron en una picadora (Alfa-Laval, Krämer+Grebe, modelo Wetter, Alemania) hasta obtener trozos de aproximadamente 1,5 cm de lado, y se mezcló manualmente con el fin de homogenizar el lote. Se empacó en 4 baldes plásticos con 13 kg de piel cada uno (se utilizaron en las pruebas de escalamiento) y el resto en bolsas metalizadas con 600 g de piel (se utilizaron en la optimización del pretratamiento ácido y en la etapa de extracción). Los baldes y las bolsas se almacenaron a -20 °C (ver Figura 15). Los baldes se descongelaron a 4 °C por 72 horas y las bolsas se descongelaron a 4 °C por 24 horas antes de su uso en las diferentes pruebas.

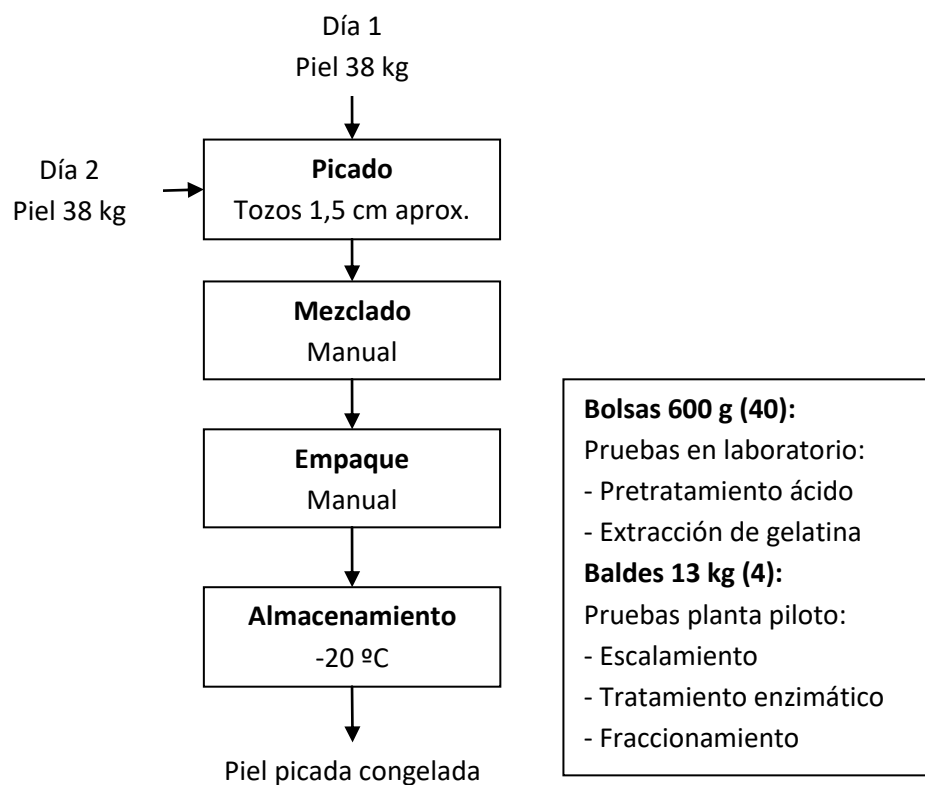


Figura 15. Flujo de proceso para la preparación de la piel de atún para realizar las pruebas a nivel de laboratorio y de planta piloto.

4.2.2 Caracterización química

A partir de 4 bolsas de 600 g de piel se determinó su contenido de humedad, grasa, proteína, cenizas y pH (ver sección 4.4).

4.3 Metodología

4.3.1 Optimización del pretratamiento ácido de la piel de atún y de la etapa de extracción, a escala de laboratorio, para obtener el licor de pescado.

El proceso de obtención del licor de pescado a nivel de laboratorio, para la optimización del pretratamiento ácido y del proceso de extracción, se representa en la Figura 16.

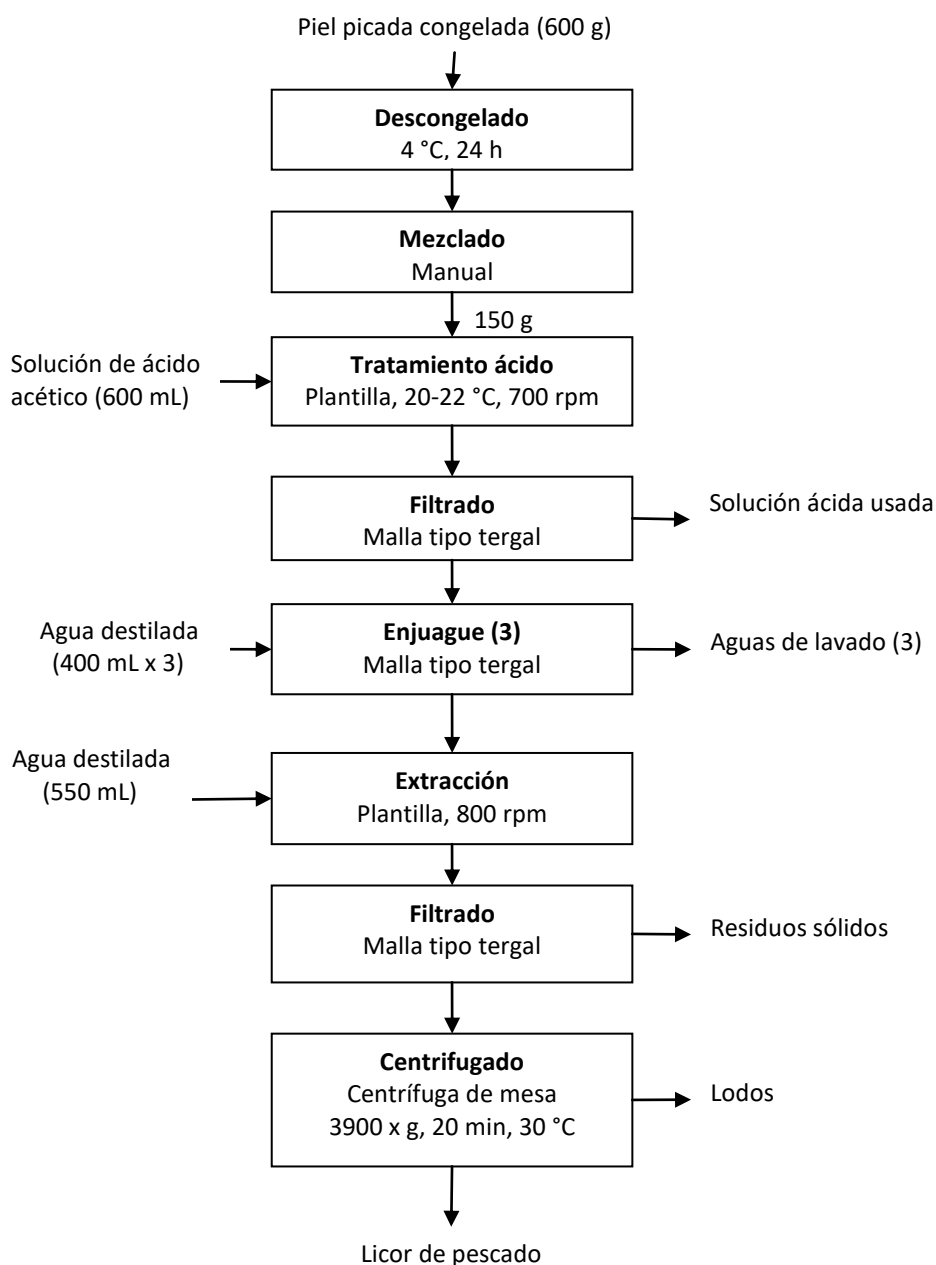


Figura 16. Flujo de proceso de la extracción del licor de pescado en el laboratorio.

4.3.1.1 Optimización del pretratamiento ácido

4.3.1.1.1 Diseño experimental

Se evaluó el efecto de la concentración de ácido acético y del tiempo del pretratamiento ácido (previo a la extracción), sobre la hidratación de la piel, la masa de

licor de pescado, rendimiento de extracción de proteínas, las temperaturas de gelificación y fusión, la fuerza y el pH del gel.

Se trabajó con la metodología de superficie de respuesta utilizando un diseño central compuesto rotatable (DCCR) de dos factores y tres repeticiones en el punto central, con el fin de optimizar esta etapa. Los factores independientes fueron el tiempo (h) y la concentración de ácido acético (M) del tratamiento. Cada factor se evaluó en 5 niveles codificados según se observa en el Cuadro IX; el rango de evaluación de los factores se definió según la revisión bibliográfica y las pruebas preliminares realizadas.

Cuadro X. Variables independientes y los niveles empleados en el diseño central compuesto rotatable para optimizar el pretratamiento ácido.

Variable independiente	Niveles codificados				
	-1,414	-1	0	1	1,414
	Niveles naturales				
Tiempo (h)	0,38	1,00	2,50	4,00	4,62
Concentración ácido acético (M)	0,000	0,050	0,172	0,295	0,344

Para este diseño se generaron 11 puntos experimentales, los cuales se realizaron de manera aleatoria para minimizar el efecto de las variables no controlables. En el Cuadro X se muestra el diseño experimental utilizado para la optimización del pretratamiento ácido.

Cuadro XI. Ensayos realizados (orden aleatorio) para optimizar el pretratamiento ácido.

Ensayo	Concentración ácido acético (M)		Tiempo (h)	
	Codificado	Natural (M)	Codificado	Natural (h)
1	0	0,172	1,414	4,62
2	0	0,172	-1,414	0,38
3	-1	0,050	1	4,00
4	0	0,172	0	2,50
5	-1,414	0,000	0	2,50
6	1	0,295	-1	1,00
7	0	0,172	0	2,50
8	1,414	0,346	0	2,50
9	-1	0,050	-1	1,00
10	1	0,295	1	4,00
11	0	0,172	0	2,50

4.3.1.1.2 Procedimiento

- a. Se tomaron bolsas de 600 g de piel descongelada, se mezclaron y se colocaron 150 g de piel en frascos de vidrio de un litro. Para cada ensayo se agregó una pastilla magnética y 600 mL de solución de ácido acético a la concentración definida en el Cuadro X. Se agitó a 700 rpm en un agitador magnético digital con placa caliente (CORNING, modelo PC-420D, EUA) a temperatura ambiente (20 a 22 °C), por el tiempo correspondiente, según lo establecido en el cuadro X.
- b. Finalizado el pretratamiento ácido, se drenó la solución ácida utilizando una manta fina tipo tergal. Se realizaron 3 lavados con 400 mL de agua destilada cada uno.
- c. A la piel hidratada se le añadieron 550 mL de agua destilada a 62 °C y se mantuvo esta temperatura, agitando a 800 rpm durante 2,5 h con un agitador magnético digital con placa caliente (CORNING, modelo PC-420D, EUA).
- d. Al finalizar la extracción se filtró el licor de pescado utilizando una manta fina (tipo tergal). El licor de pescado se colocó en frascos de centrifuga prepesados y se centrifugó a 3900 x g por 20 min a 30 °C en una centrífuga (Hermle, modelo Z-300, Alemania). Al finalizar se decantó el licor de pescado en un frasco de vidrio de 1 litro prepesado. Se pesaron los frascos de la centrífuga y el frasco de vidrio con el licor de pescado para calcular la cantidad de sólidos en suspensión y el rendimiento de extracción del licor (masa licor/masa piel inicial). El licor de pescado se almacenó en refrigeración a 4 °C durante la noche para generar un gel firme.
- e. El gel de licor de pescado se picó manualmente y colocó en bandejas prepesadas para ser congelado y secado utilizando un liofilizador (Zirbus technology GmbH, modelo Sublimator 2x3x3, Alemania) en las condiciones expuestas en el anexo 8.2. Se pesaron las bandejas con la proteína deshidratada y se midió su humedad para obtener el rendimiento de extracción de proteína (masa proteína deshidratada/masa de piel inicial). Posteriormente se midieron la fuerza del gel, las temperaturas de

gelificación y fusión y la distribución de tamaños de las proteínas rehidratadas (ver sección 4.4).

4.3.1.1.3 Análisis estadístico

A partir de los resultados obtenidos de la optimización del pretratamiento ácido, se generaron los modelos de las superficies de respuesta utilizando el programa estadístico JMP 8 (SAS, EUA), con el fin de estimar el modelo de mejor ajuste para cada variable respuesta. Este mismo programa se utilizó para la designación y aleatorización de los puntos experimentales, el análisis de varianza y las representaciones gráficas. El coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de determinación ajustado (R^2 -adj), la probabilidad del modelo (p), la probabilidad de falta de ajuste (P_{fa}) y la distribución de los residuos se utilizaron para determinar si los modelos matemáticos generados presentaban buen ajuste y eran significativos. En la ecuación del modelo sólo se utilizaron los coeficientes de los parámetros que resultaron significativos en el análisis de varianza, empleando un nivel de confianza de 95%. Para todas las variables respuesta se procuró encontrar una zona donde se maximicen los valores obtenidos. También se utilizó el programa estadístico JMP 8 (SAS, EUA) para evaluar la correlación de las variables respuesta utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

4.3.1.1.4 Verificación del modelo

Para verificar que los modelos matemáticos obtenidos del DCCR eran adecuados, se realizaron tres ensayos adicionales utilizando los valores óptimos de concentración de ácido y tiempo definidos por el modelo. Se realizó el mismo procedimiento descrito en la sección 4.3.1.1.2. Los resultados obtenidos se compararon con los predichos por los modelos. Para determinar que el modelo es adecuado, se determinó el porcentaje de error del valor obtenido respecto al predicho y se evaluó si el intervalo de confianza (al 95%) de los valores predichos se traslapaba con el intervalo de confianza (al 95%) de los promedios de los valores obtenidos experimentalmente para cada variable respuesta.

4.3.1.2 Optimización de la etapa de extracción

4.3.1.2.1 Diseño experimental

En el caso de la etapa de extracción, se evaluó el efecto de la temperatura y del tiempo de extracción sobre el rendimiento de extracción de proteínas en el licor de pescado, las temperaturas de gelificación y de fusión, y la fuerza del gel.

Se utilizó la metodología de superficie de respuesta utilizando un DCCR, de dos factores y tres repeticiones en el punto central, con el fin de optimizar esta etapa. Los factores independientes son la temperatura (°C) y el tiempo (h). Cada factor se evaluó en 5 niveles codificados según se observa en el Cuadro XI; el rango de evaluación de los factores se definió según la revisión bibliográfica y las pruebas preliminares realizadas.

Cuadro XII. Variables independientes y los niveles empleados en el diseño central compuesto rotatable para optimizar el tratamiento de extracción.

Variable independiente	Niveles codificados				
	-1,414	-1	0	1	1,414
	Niveles naturales				
Tiempo (h)	0,38	1,00	2,50	4,00	4,62
Temperatura (°C)	37	45	62	80	87

Para este diseño se generaron 11 puntos experimentales, los cuales se realizaron de manera aleatoria para minimizar el efecto de las variables no controlables. En el cuadro XII se muestra el diseño experimental utilizado para la optimización de la etapa de extracción con agua caliente.

Cuadro XIII. Ensayos realizados (orden aleatorio) en la optimización del tiempo y de la temperatura de extracción de proteínas.

Ensayo	Tiempo		Temperatura	
	Codificado	Natural (h)	Codificado	Natural (°C)
1	-1,414	0,38	0	62
2	1	4,00	1	80
3	-1	1,00	-1	45

Cuadro XII (continuación). Ensayos realizados (orden aleatorio) en la optimización del tiempo y de la temperatura de extracción de proteínas.

Ensayo	Tiempo		Temperatura	
	Codificado	Natural (h)	Codificado	Natural (°C)
4	-1	1,00	1	80
5	0	2,50	0	62
6	0	2,50	0	62
7	1,414	4,62	0	62
8	0	2,50	0	62
9	0	2,50	1,414	87
10	1	4,00	-1	45
11	0	2,50	-1,414	37

4.3.1.2.2 Procedimiento

a. Se tomaron bolsas de 600 g de piel descongelada, se mezclaron y se colocaron 150 g de piel en frascos de vidrio de un litro. Para cada ensayo, se agregó una pastilla magnética y 600 mL de solución de ácido acético a la concentración óptima (definida en la sección 4.3.1.1). Se agitó a 700 rpm en un agitador magnético digital con placa caliente (CORNING, modelo PC-420D, EUA) a temperatura ambiente (20 a 22 °C), por el tiempo elegido (definido en la sección 4.3.1.1).

b. Finalizado el pretratamiento ácido, se drenó la solución ácida, utilizando una manta fina tipo tergal. Se realizaron 3 lavados con 400 mL de agua destilada cada uno.

c. A la piel hidratada se le añadieron 550 mL de agua destilada con una temperatura 7 °C mayor a la temperatura definida en el Cuadro XII. Se mantuvo la temperatura definida en el Cuadro XII, agitando a 800 rpm durante el tiempo definido en el mismo cuadro, con un agitador magnético digital con placa caliente (CORNING, modelo PC-420D, EUA).

d. Al finalizar la extracción se filtró el licor de pescado utilizando una manta fina (tipo tergal). El licor de pescado se colocó en frascos de centrifuga prepesados y se centrifugó a 3900 x g por 20 min a 30 °C en una centrifuga (Hermle, modelo Z-300, Alemania). Al finalizar se decantó el licor de pescado en un frasco de vidrio de 1 litro

prepesado. Se pesaron los frascos de la centrífuga y el frasco de vidrio con el licor de pescado para calcular la cantidad de sólidos en suspensión y el rendimiento de extracción del licor (masa licor/masa piel inicial). El licor de pescado se almacenó en refrigeración a 4 °C durante la noche para generar un gel firme.

e. El gel de licor de pescado se picó manualmente y se colocó en bandejas prepesadas para ser congelado y secado utilizando un liofilizador (Zirbus technology GmbH, modelo Sublimator 2x3x3, Alemania) en las condiciones expuestas en el anexo 8.2. Se pesaron las bandejas con la proteína deshidratada y se midió su humedad para obtener el rendimiento de extracción de proteína (masa proteína deshidratada/masa de piel inicial). Posteriormente se midieron la fuerza de gel, las temperaturas de gelificación y fusión y la distribución de tamaños de las proteínas rehidratadas (ver sección 4.4).

4.3.1.2.3 Análisis estadístico

A partir de los resultados obtenidos de la optimización de la etapa de extracción, se generaron los modelos de las superficies de respuesta utilizando el programa estadístico JMP 8 (SAS, EUA), con el fin de estimar el modelo de mejor ajuste para cada variable respuesta. Este mismo programa se utilizó para la designación y aleatorización de los puntos experimentales, el análisis de varianza y las representaciones gráficas. El coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de determinación ajustado (R^2 -adj), la probabilidad del modelo (p), la probabilidad de falta de ajuste (P_{fa}) y la distribución de los residuos se utilizaron para determinar si los modelos matemáticos generados presentan buen ajuste y son significativos. En la ecuación del modelo sólo se utilizaron los coeficientes de los parámetros que resultaron significativos en el análisis de varianza, empleando un nivel de confianza de 95%. Para todas las variables respuesta se procuró encontrar una zona donde se maximicen los valores obtenidos. También se utilizó el programa estadístico JMP 8 (SAS, EUA) para evaluar la correlación de las variables respuesta utilizando el coeficiente de correlación de Pearson.

4.3.1.2.4 Verificación del modelo

Para verificar que los modelos matemáticos obtenidos del DCCR son adecuados, se realizaron tres ensayos adicionales utilizando los valores óptimos de tiempo y temperatura de extracción definidos por el modelo. Se realizó el mismo procedimiento descrito en la sección 4.3.1.2.2. Los resultados obtenidos se compararon con los predichos por los modelos. Para determinar que el modelo es adecuado, se determinó el porcentaje de error del valor obtenido respecto al predicho y se evaluó si el intervalo de confianza (al 95%) de los valores predichos se traslapa con el intervalo de confianza (al 95%) de los promedios de los valores obtenidos experimentalmente para cada variable respuesta.

4.3.2 Escalamiento, a nivel piloto, del proceso de extracción de proteínas para obtener el licor de pescado en mayor volumen

Se simuló el proceso de extracción de licor definido a nivel de laboratorio en el objetivo 1 (descrito en la sección 4.3.1) con los equipos disponibles en el anexo de la planta piloto (ver Figura 17), para poder procesar una cantidad de piel 80 veces mayor (12 kg) a la utilizada a nivel de laboratorio.

4.3.2.1 Diseño experimental

Se aplicó un diseño irrestricto aleatorio con dos tratamientos: escala laboratorio y escala planta piloto. Cada tratamiento se realizó por triplicado, siguiendo el procedimiento que se expone en las secciones 4.3.2.2.1 y 4.3.2.2.2, respectivamente. Para cada tratamiento se evaluó el rendimiento, el pH, el contenido de humedad, proteína, grasa y cenizas del licor de pescado y todos los subproductos del proceso. Además, se midió la fuerza de gel y las temperaturas de gelificación y fusión.

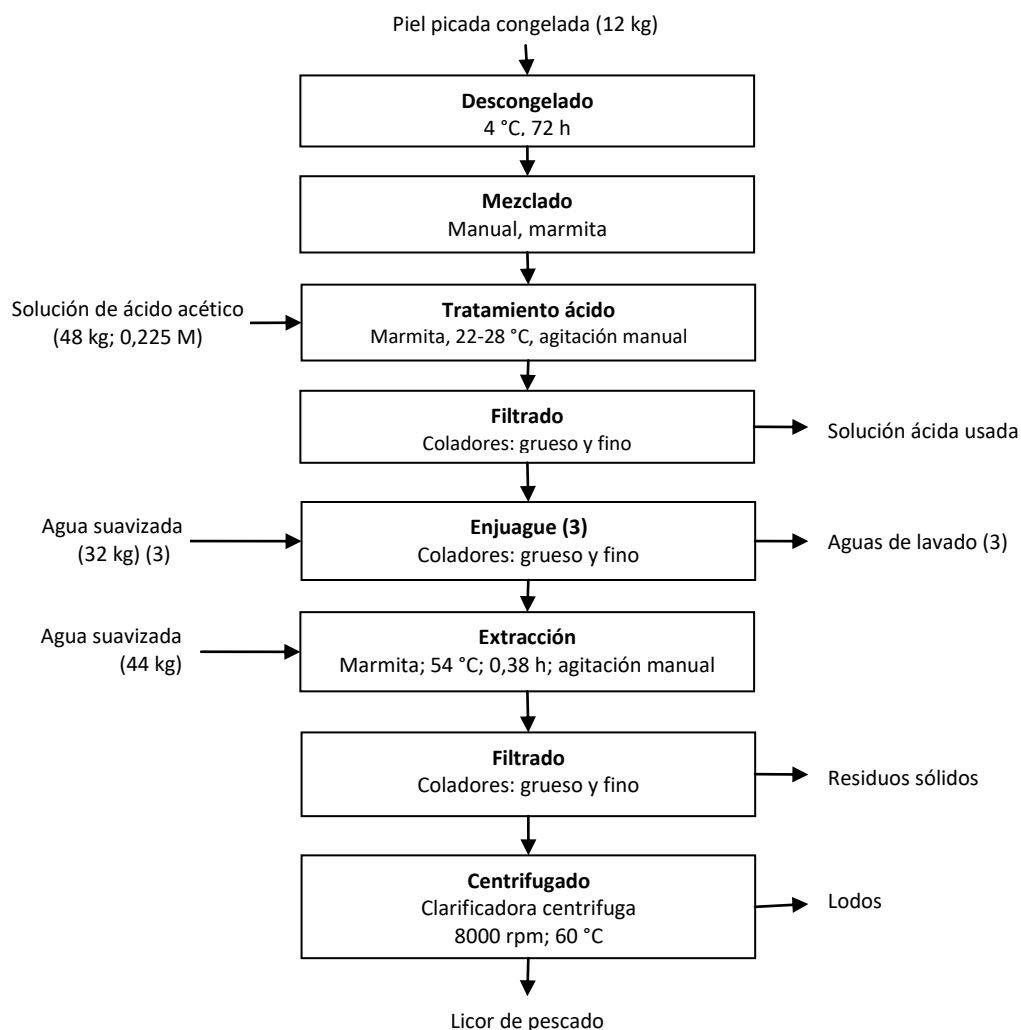


Figura 17. Flujo de proceso de la extracción del licor de pescado a escala de planta piloto.

4.3.2.2 Procedimiento

4.3.2.2.1 Escala de laboratorio

a. Para la extracción del licor a escala de laboratorio se siguió el procedimiento descrito en la sección 4.3.1.2.2, modificando la etapa de extracción (apartado c) para utilizar agua a 54 °C y un tiempo de 0,38 h.

b. Se midió la masa total y se tomaron muestras de la piel inicial, la solución ácida utilizada, las aguas de lavado (4), la piel final y del licor de pescado para calcular los

rendimientos del proceso y analizar su contenido de humedad, proteína, grasa, cenizas y su pH (ver sección 4.4).

c. Se le mide la fuerza de gel, las temperaturas de gelificación y fusión y la distribución de tamaño de las proteínas rehidratadas (ver sección 4.4), obtenidas en el licor de pescado final.

4.3.2.2 Escala de planta piloto

a. Se tomó un balde de 13 kg de piel descongelada, se colocó en una marmita de vapor de 82 L de capacidad y se mezcló. Se tomó una muestra de 1 kg para realizar análisis de contenido de proteína, grasa, humedad, carbohidratos, cenizas y pH de la piel inicial. Se agregaron 48 kg de solución de ácido acético (0,225 M). Se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente (22 a 28 °C), agitándola manualmente por 2,5 h.

b. Finalizado el pretratamiento ácido, se separó la piel hidratada y la solución de ácido acético utilizando dos coladores, uno de malla gruesa y otro de malla fina. Se pesó y mezcló la solución ácida separada y se tomó una muestra de 1 kg para analizar su contenido de humedad, proteína, grasa, cenizas y su pH.

c. La piel y los sólidos gruesos se pesaron y se colocaron en la misma marmita y se añadió 32 kg de agua suavizada, se mezcló manualmente por 5 min y se separó la piel hidratada lavada y el agua de lavado utilizando dos coladores en serie, uno de malla gruesa y otro de malla fina. Se pesó y mezcló el agua de lavado y se tomó una muestra de 1 kg para analizar su contenido de humedad, proteína, grasa, cenizas y su pH. Esta etapa se repitió 2 veces más para un total de 3 lavados y 3 muestras de aguas de lavado.

d. La piel hidratada y lavada se pesó y se colocó en la misma marmita, se añadieron 44 kg de agua suavizada a 72 °C y se mezcló manualmente por 0,38 h (23 min) a una temperatura de 54 °C. Al finalizar el tiempo se separó la piel restante y el licor de pescado utilizando dos coladores en serie, uno de malla gruesa y otro de malla fina. Se

pesó y mezcló la piel final y se tomó una muestra de 1 kg para analizar su contenido de humedad, proteína, grasa, cenizas y su pH.

e. El licor de pescado se calentó a 60 °C en una marmita y se centrifugó en una clarificadora centrífuga (Westfalia Separador, modelo AG Oelde, Alemania) para separar los lodos (grasa y sólidos en suspensión). Al finalizar el proceso se pesaron y recolectaron los lodos para analizar su contenido de humedad, proteína, grasa, cenizas y su pH.

f. Se pesó el licor de pescado final y se tomó una muestra de 1 kg para analizar su contenido de humedad, proteína, grasa, cenizas y su pH. Además se tomó una muestra de 1 kg de licor de pescado y se colocó en bandejas prepesadas para ser congelado y secado utilizando un liofilizador (Zirbus technology GmbH, modelo Sublimator 2x3x3, Alemania) en las condiciones expuestas en el Anexo 8.2. Se pesaron las bandejas con la proteína deshidratada para obtener el rendimiento de extracción de proteína (masa proteína deshidratada/masa de piel inicial). Posteriormente se midieron la fuerza de gel, las temperaturas de gelificación y fusión y la distribución de tamaños de las proteínas rehidratadas (ver sección 4.4)

g. El resto del licor de pescado se colocó en cubetas plásticas y se almacenó a -20 °C para ser utilizado en las pruebas de fraccionamiento.

4.3.2.3 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba t de Student (nivel de confianza de 95%), empleando el programa JMP 8 (SAS, EUA), para comparar los rendimientos de extracción del licor de pescado, la fuerza del gel, las temperaturas de gelificación y fusión de la gelatina extraída, además del contenido de humedad, grasa, proteína y cenizas y el pH del licor de pescado y los residuos obtenidos a nivel de laboratorio y los obtenidos a nivel de planta piloto (ver Figuras 16 y 17, respectivamente).

4.3.3 Evaluación de diferentes tecnologías de membrana para el fraccionamiento de las proteínas extraídas del licor de pescado.

4.3.3.1 Tratamiento enzimático del licor de pescado

4.3.3.1.1 Diseño experimental

Para el tratamiento enzimático se trabajó con la proteasa comercial Novo-Pro D[®] producida por Novozymes[®] y donada por la empresa Trisan Food & Tech (San José, Costa Rica), enzima serina endoproteasa que hidroliza enlaces peptídicos internos, permitiendo la producción de cadenas proteicas con diferentes tamaños moleculares.

Se evaluó el efecto de la concentración de la enzima y del tiempo del tratamiento enzimático sobre la fuerza del gel y las temperaturas de gelificación y fusión de las proteínas del licor de pescado. Se utilizó la metodología de superficie de respuesta utilizando un DCCR, de dos factores y tres repeticiones en el punto central, con el fin de optimizar esta etapa. Los factores independientes fueron la concentración de enzima ($\mu\text{L}/\text{kg}$) y el tiempo (min). Cada factor se evaluó en 5 niveles codificados según se observa en el Cuadro XIII; el rango de evaluación de los factores se definió en pruebas preliminares.

Cuadro XIV. Variables independientes y los niveles empleados en el diseño central compuesto rotatable para optimizar el tratamiento enzimático del licor de pescado.

Variable independiente	Niveles codificados				
	-1,414	-1	0	1	1,414
	Niveles naturales				
Tiempo (min)	10	13	20	27	30
Concentración de enzima ($\mu\text{L}/\text{kg}$)	0	11	38	64	75

Para este diseño se generaron 11 puntos experimentales, los cuales se realizaron de manera aleatoria para minimizar el efecto de las variables no controlables. En el Cuadro XIV se muestra el diseño experimental utilizado para la optimización del tratamiento enzimático.

Cuadro XV. Ensayos realizados (orden aleatorio) en la optimización del tiempo y de la concentración de enzima del tratamiento enzimático.

Ensayo	Tiempo		Concentración de enzima	
	Codificado	Natural (min)	Codificado	Natural ($\mu\text{L}/\text{kg}$)
1	-1	13	-1	11
2	1,414	30	0	38
3	-1	13	1	64
4	-1,414	10	0	38
5	0	20	0	38
6	1	27	-1	11
7	1	27	1	64
8	0	20	0	38
9	0	20	-1,414	0
10	0	20	1,414	75
11	0	20	0	38

4.3.3.1.2 Procedimiento

a. Se preparó un lote de 40 kg de licor de pescado siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.3.2.2.1.

b. Se colocó 1 kg de licor de pescado en frascos de vidrio de un litro. Para cada ensayo, se agregó una pastilla magnética y se calentó, en un agitador magnético digital con placa caliente (CORNING, modelo PC-420D, EUA), hasta alcanzar los 60 °C agitando a 800 rpm. Se agregó la enzima en la cantidad indicada en el Cuadro XIV para cada ensayo y se mantuvo la temperatura y la agitación por el tiempo indicado.

b. Finalizado el tiempo del tratamiento, se calentó el licor, en un agitador magnético digital con placa caliente (CORNING, modelo PC-420D, EUA), hasta alcanzar los 85 °C y se mantuvo esta temperatura por 15 min, agitando a 800 rpm para inactivar la enzima.

c. El licor de pescado tratado se dejó enfriar a temperatura ambiente (20 a 22 °C) y se almacenó en refrigeración a 4 °C durante 18 h para generar un gel firme.

d. El gel de licor de pescado se picó manualmente y colocó en bandejas prepesadas para ser congelado y secado utilizando un liofilizador (Zirbus technology GmbH,

modelo Sublimator 2x3x3, Alemania) en las condiciones expuestas en el anexo 8.2. Se utilizó el material deshidratado para medir la fuerza de gel, las temperaturas de gelificación y fusión y la distribución de tamaños de las proteínas (ver sección 4.4).

4.3.3.1.3 Análisis estadístico

A partir de los resultados obtenidos de la optimización del tratamiento enzimático, se generaron los modelos de las superficies de respuesta utilizando el programa estadístico JMP 8 (SAS, EUA), con el fin de estimar el modelo de mejor ajuste para cada variable respuesta. Este mismo programa se utilizó para la designación y aleatorización de los puntos experimentales, el análisis de varianza y las representaciones gráficas. El coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de determinación ajustado (R^2 -adj), la probabilidad del modelo (p), la probabilidad de falta de ajuste (P_{fa}) y la distribución de los residuos se utilizaron para determinar si los modelos matemáticos generados presentaron buen ajuste y son significativos.

En la ecuación del modelo sólo se utilizaron los coeficientes de los parámetros que resultaron significativos en el análisis de varianza, empleando un nivel de confianza de 95%. Para todas las variables respuesta se procuró encontrar una zona donde se maximizaron los valores obtenidos.

4.3.3.2 Fraccionamiento de las proteínas del licor de pescado

Se fraccionaron las proteínas del licor de pescado en función de su tamaño, para obtener productos con características funcionales diferenciadas. Para esto se utilizaron 4 membranas (ver Cuadro XV). El licor de pescado tratado enzimáticamente se filtró primero empleando la membrana de 0,8 μ m y las siguientes filtraciones se realizaron a partir del permeado de la filtración anterior (ver Figura 18).

Cuadro XVI. Punto de corte de las membranas a utilizar en el fraccionamiento de las proteínas del licor de pescado.

Membrana	Punto de corte de la membrana
1	0,8 μm (800 nm)
2	100 nm
3	50 nm
4	20 nm

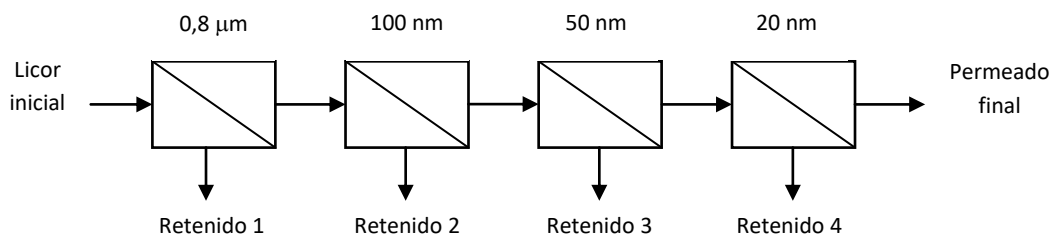


Figura 18. Diagrama del fraccionamiento de proteínas por tecnología de membranas.

Se utilizó una unidad piloto de microfiltración/ultrafiltración, que cuenta con una bomba centrífuga que provee el flujo tangencial, una bomba neumática de diafragma que otorga la alimentación y presión y un intercambiador de calor que permite controlar la temperatura. Las membranas utilizadas son de módulo tubular de cerámica alúmina zircón de Membralox® (Pall, EUA), con un tamaño de poro de acuerdo con el proceso correspondiente, 1,02 m de largo, 19 canales de 4 mm de diámetro y un área efectiva de 0,24 m². El esquema de la unidad piloto de filtración se observa en la Figura 19.

4.3.3.2.1 Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental irrestricto aleatorio para evaluar el efecto de cada filtración sobre la fuerza de gel y las temperaturas de gelificación y fusión de las proteínas de pescado presentes en la materia prima (alimentación) y los productos obtenidos (retenido y permeado), según se observa en el cuadro XVI. Este diseño se aplicó para cada filtración y se realizó por triplicado.

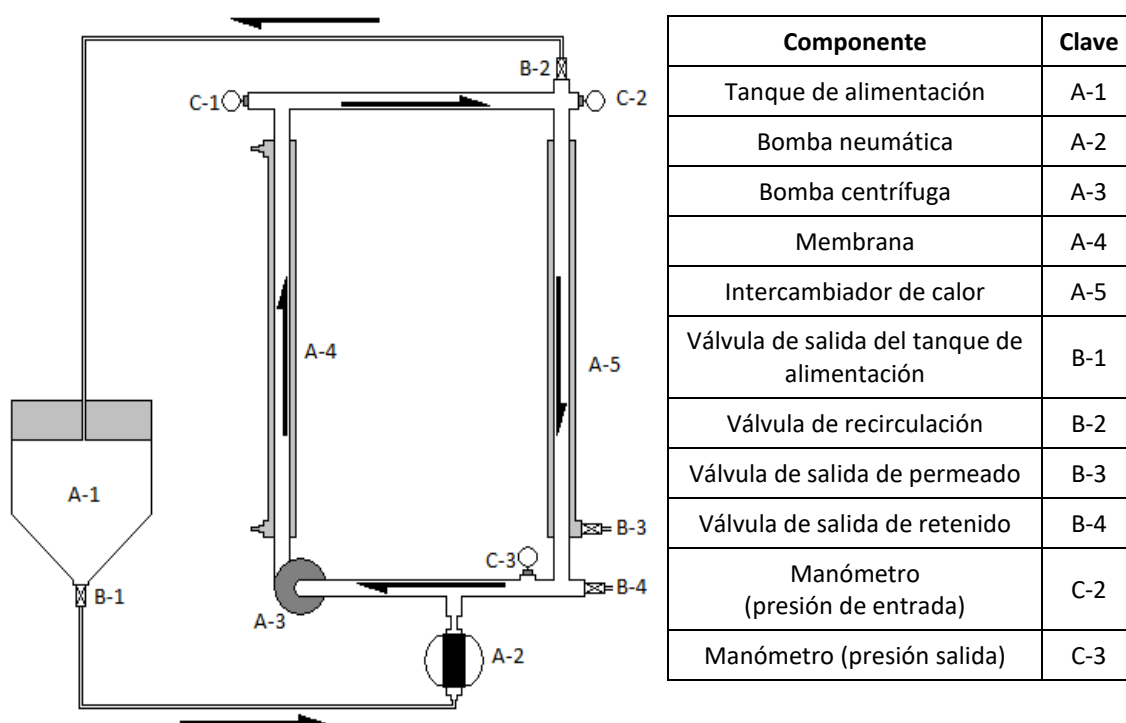


Figura 19. Diagrama del equipo de MFT/UFT.

Cuadro XVII. Diseño experimental para la evaluación de la filtración de cada membrana sobre el fraccionamiento de las proteínas del licor de pescado.

Tratamiento	Fracción
1	Alimentación
2	Permeado
3	Retenido

También se utilizó un diseño experimental irrestricto aleatorio para evaluar el proceso general (ver Figura 18) sobre la concentración, la fuerza de gel y las temperaturas de gelificación y fusión de las proteínas de los diferentes tratamientos, según se observa el Cuadro XVII. Los ensayos se realizaron por triplicado.

4.3.3.2.2 Procedimiento

a. En todas las filtraciones se trabajó con una temperatura de 60 °C, una velocidad tangencial de 6,1 m/s y una presión transmembranaria de 124,1 kPa (1,24 bar).

Cuadro XVIII. Diseño experimental para la evaluación del efecto del proceso de fraccionamiento por membranas sobre las características de las diferentes fracciones.

Tratamiento	Fracción
1	Licor inicial
2	Retenido 0,8 μm
3	Retenido 100 nm
4	Retenido 50 nm
5	Retenido 20 nm
6	Permeado 20 nm

b. Se realizó el tratamiento enzimático al licor de pescado según los resultados obtenidos en la sección 4.3.3.1. Se pesó y colocó el licor de pescado en una marmita de vapor de 82 L de capacidad, se calentó hasta alcanzar 60 °C y después se agregaron 38 μL de la enzima Novo-Pro D[®] por kilogramo de licor de pescado. Se agitó manualmente manteniendo la temperatura por 20 min. Al finalizar el tiempo se calentó el licor hasta los 85 °C y se mantuvo esta temperatura por 15 min para inactivar la enzima. Se tomó una muestra de 1 kg, se secó en un liofilizador (Zirbus technology GmbH, modelo Sublimator 2x3x3, Alemania) en las condiciones expuestas en el anexo 8.2 y se midió la fuerza del gel, las temperaturas de gelificación y fusión y la distribución de tamaño de las proteínas.

c. El licor se enfrió hasta alcanzar los 60 °C y después se inició la filtración utilizando la membrana de 0,8 μm de diámetro de poro, en modo de concentración (sin retirar el retenido). Durante el ensayo se tomaron manualmente los datos de flujo de permeado, temperatura del retenido, presión de entrada y presión de salida de la membrana, para mantener los valores de P_{tm} y temperatura estables, en los valores expuestos en el apartado a. de esta sección, modificando la presión de aire de entrada y el flujo de agua fría al intercambiador de calor.

d. Al finalizar la filtración, se tomaron muestras de 1 kg del retenido y del permeado y se almacenaron en refrigeración (4 °C) por 18 h para generar un gel. Posteriormente se picaron los geles y se colocaron en bandejas para ser congelados y secados utilizando un liofilizador (Sublimator 2x3x3, Zirbus technology GmbH, Alemania) en las

condiciones expuestas en el Anexo 8.2. Se pesó la proteína deshidratada y se midió su fuerza de gel, y las temperaturas de gelificación y fusión (ver sección 4.4). El resto del permeado se almacenó en baldes a temperatura de refrigeración (4 °C) hasta que se utilizó en la filtración con la membrana de 100 nm de diámetro de poro. La membrana se limpio siguiendo el procedimiento que se muestra en el Anexo 8.3.

e. Se repitió el proceso descrito en los apartados c y d de esta sección con las membranas de 100 nm, 50 nm y 20 nm, utilizando como alimentación el permeado obtenido en las filtraciones de 0,8 μm , 100 nm y 50 nm, respectivamente.

f. Se midió la distribución de tamaño de las proteínas fraccionadas para caracterizar el tipo de cadenas de proteínas y las diferencias de tamaños según la tecnología de membrana aplicada, siguiendo la metodología que se describe en la sección 4.4.8.

4.3.3.2.3 Análisis estadístico

Para el primer diseño, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía para determinar el efecto de cada filtración sobre la fuerza de gel y las temperaturas de gelificación y fusión de las proteínas en las diferentes fracciones (licor de alimentación, retenido y permeado). Cuando se determinaron diferencias significativas, los promedios de cada variable respuesta se compararon utilizando una prueba de Tukey (nivel de confianza de 95%) usando el programa JMP 8 (SAS, EUA).

Para el segundo diseño, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía para comparar las características de fuerza de gel y temperaturas de gelificación y fusión de las proteínas en las diferentes fracciones obtenidas en el proceso de membranas en serie (según se observa en la Figura 17). Cuando se determinaron diferencias significativas, los promedios de cada variable respuesta se compararon utilizando una prueba de Tukey (nivel de confianza de 95%) usando el programa JMP 8 (SAS, EUA).

4.4 Análisis físico-químicos

4.4.1 Determinación de pH

Se determinó según el método AOAC 981.12 (AOAC, 1999). En el caso del pH del gel de gelatina se realizó en un gel de gelatina en agua destilada al 6,67% (m/v).

4.4.2 Determinación de humedad

Se determinó según el método AOAC 920.151 (AOAC, 2005).

4.4.3 Determinación de proteína

Se determinó según el método AOAC 920.152 (AOAC, 2005).

4.4.4 Determinación de grasa

Se determinó según el método de Carpenter et al. (1992).

4.4.5 Determinación de cenizas

Se determinó según el método AOAC 940.26 (AOAC, 2005).

4.4.6 Determinación de la fuerza del gel

Se determinó modificando levemente el proceso expuesto por Gómez-Guillén et al. (2002), usando geles de 6,67 % (m/v) formados por la disolución de la proteína en agua destilada a 60 °C y enfriados posteriormente a 4 °C entre 16 y 18 horas. La resistencia del gel se midió a 4 °C usando muestras con 4,3 cm de diámetro y 4,5 cm de altura en un texturómetro TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Londres, Inglaterra) equipado con un émbolo cilíndrico de cara plana de 1,27 cm de diámetro a una velocidad de 1 mm/s. La resistencia del gel se expresa como la fuerza máxima (g), obtenida cuando el émbolo penetre 4 mm en los geles.

4.4.7 Determinación del porcentaje de hidratación de la piel y del rendimiento de las etapas de proceso de la extracción del licor de pescado

El porcentaje de hidratación y el rendimiento de las etapas de proceso de extracción se calcularon relacionando la masa de piel hidratada o del producto de cada etapa respecto a la masa de piel de atún inicial, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Hidratación o rendimiento} = \frac{\text{masa de producto}}{\text{masa de piel inicial}} * 100 \quad (7)$$

4.4.8 Determinación de la distribución de tamaño de las proteínas

La distribución del tamaño de las proteínas extraídas se determinó usando electroforesis de duodecilsulfato de sodio en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés), según el método de Laemmli (1970) con pequeñas modificaciones.

Se tomaron 3 mg de proteínas liofilizadas y se agregaron 750 μ l de agua destilada para obtener una concentración final de 4 mg/mL. La disolución se calentó a 60 °C por 20 min agitando a 800 rpm, utilizando un baño TermoMixer® (Eppendorf, Alemania). Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 5 min en una centrifuga MiniSpin® (Eppendorf, Alemania). Se mezcló la solución de proteínas con un buffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, glicerol, 4% SDS y 5% 2-mercaptoetanol (2-Me)) en una proporción 3:1. La muestra se calentó a 100 °C por 5 min en un baño seco digital (Boekel Scientific, EUA.). Para las muestras obtenidas en el objetivo 1 se utilizó un gel comercial de gradiente de 12 celda (8-16% Precise™ Tris-Glycine gel, Thermo Scientific, EUA). Para las muestras del objetivo 2 y el objetivo 3 se utilizó un gel comercial de gradiente de 12 celdas (4-15% Mini.PROTEAN® TGX Free™, Bio-Rad®, EUA). Se cargaron 10 μ L de muestra en cada celda y se realizó la electroforesis utilizando un Mini Protean® Tetra System (Bio-Rad, EUA) a 200 V, utilizando el marcador molecular Standard Precision Plus Protein™ (Bio-Rad, EUA). Se extrajo el gel y se colocó en un fijador por 15 min; posteriormente se tiñó con azul Coomassie R-250. Se utilizó el programa ChemicDoc™ XRS+ System

con Image Lab™ (Bio-Rad, EUA) para digitalizar y analizar la distribución de tamaño de la proteína y su proporción.

4.4.9 Evaluación del comportamiento viscoelástico por pruebas de oscilación para la determinación de las temperaturas de gelificación y fusión

Se determinó modificando levemente el procedimiento expuesto por Gómez-Guillén et al. (2002), usando geles de 6,67% (m/v) formados por la disolución de la proteína en agua destilada. Se utilizó un reómetro rotatorio Anton Paar MCR51 (Physica, Austria), con un sensor de cono plato (ángulo 1°). Enfriando de 40 a 5°C y calentando de 5 a 40°C, a una velocidad de barrido de 1°C/min, una frecuencia de 1 Hz y un estrés de oscilación de 3,0 Pa. El módulo elástico (G' , Pa), el módulo viscoso (G'' , Pa) y el ángulo de fase (δ , °) se representaron en función de la temperatura. Se determinaron las temperaturas de gelificación y fusión cuando se alcanzó un ángulo de fase de 45° durante el enfriamiento y el calentamiento, respectivamente.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización química de la materia prima

Se realizó la caracterización de la piel de atún obtenida del proceso de producción de lomos de atún frescos, proporcionada por la empresa Tunatun S.A. En el Cuadro XVIII se observa la composición química de la piel de atún utilizada en este proyecto.

Cuadro XIX. Composición química de la piel de atún obtenida del proceso de producción de lomos de atún fresco, utilizada para la extracción del licor de pescado.

Variable respuesta	Base húmeda*
Humedad (g /100 g)	59 ± 2
Proteína (g / 100 g)	28 ± 3
Grasa (g / 100 g)	6 ± 1
Ceniza (g / 100 g)	4,2 ± 0,5
pH	6,0 ± 0,2

* Promedio ± intervalo de confianza (nivel de confianza de 95%, n = 4).

El principal componente de la piel utilizada es el agua. Similar contenido de humedad en la piel de atún aleta amarilla reportaron Rahman et al. (2008) (60,1% ± 1,2%, procedente de Oman) y Sousa et al. (2017) (62,57% ± 2,40%, procedente del sur de Europa). Un contenido levemente menor (56,1%) reportaron Cho et al. (2005) en piel de atún aleta amarilla en Corea del Sur. Rahman et al. (2008) y Cho et al. (2005) determinaron un mayor contenido de grasa (9,2% ± 0,1% y 6,8%, respectivamente) y Sousa et al. (2017) un contenido menor (3,22% ± 0,72%). En los tres estudios se reportaron menores contenidos de ceniza (1,1% ± 0,1%, 1,0% y 0,67% ± 0,14%, respectivamente) respecto a los obtenidos en este estudio.

Los resultados evidencian el alto contenido de proteína de la piel de atún aleta amarilla. Rahman et al. (2008) encontraron un contenido similar (28,8% ± 0,3%), mientras que Cho et al. (2005) y Sousa et al. (2017) obtuvieron contenidos mayores (33,6% y 32,38% ± 2,04%, respectivamente). Dentro de la proteína de la piel se encuentra el colágeno, precursor de la gelatina. Cho et al. (2005) reportaron un

contenido de colágeno de 13,54% en la piel de atún aleta amarilla. Las diferencias entre la composición de la piel obtenida en este trabajo y las obtenidas en otros estudios se pueden deber a factores como la procedencia, la temporada del año de la captura, la alimentación y el estado fisiológico de cada individuo.

5.2 Optimización del pretratamiento ácido de la piel de atún y de la etapa de extracción, a escala de laboratorio, para obtener el licor de pescado.

5.2.1 Optimización del pretratamiento ácido

Para la optimización del pretratamiento ácido se consideraron preliminarmente tres variables independientes: temperatura (ambiente de 20 °C a 22 °C o refrigeración), concentración del ácido acético y tiempo del proceso. La primera variable se descartó porque se determinó que con la infraestructura disponible a nivel de planta piloto no era posible aplicar el proceso a temperatura de refrigeración. Se optimizó el pretratamiento ácido respecto a dos factores: el tiempo y la concentración de ácido acético, utilizando la metodología de superficie de respuesta empleando un DCCR. La optimización se realizó en función del porcentaje de hidratación de la piel, la masa del licor extraída, el rendimiento de extracción de las proteínas en el licor de pescado, la fuerza del gel, las temperaturas de gelificación y fusión y el pH del gel (6,67% m/v). También se evaluó la distribución de tamaño de las proteínas extraídas.

Al aplicar el DCCR se obtiene un polinomio de segundo grado como se observa a continuación:

$$Y = c_0 + c_1X_1 + c_2X_2 + c_3X_1^2 + c_4X_2^2 + c_4X_1X_2 \quad (8)$$

El modelo se ajusta a los resultados obtenidos en las variables respuesta (ver Cuadros XIX y XX), donde Y representa el valor de la variable dependiente (respuesta), c_n representan los coeficientes de regresión del modelo y X_1 y X_2 el valor de las variables independientes (la concentración del ácido acético y el tiempo del pretratamiento ácido, respectivamente).

Cuadro XX. Efecto de la concentración de ácido acético y el tiempo del pretratamiento ácido, sobre diferentes características del proceso de extracción del licor de pescado.

Variables independientes (X)		Variables dependientes (Y)		
Concentración ácido acético (M)	Tiempo (h)	Hidratación de la piel (%)	Masa licor de pescado (g)	Rendimiento extracción de proteínas (%)
0,050	1,00	110,14	479,62	13,25
0,295	1,00	131,65	497,56	13,12
0,050	4,00	102,00	454,92	11,70
0,295	4,00	170,23	526,66	12,80
0,172	0,38	124,73	472,32	13,18
0,172	4,62	164,03	503,08	13,77
0,000	2,50	7,53	380,38	12,43
0,346	2,50	154,04	501,11	13,82
0,172	2,50	153,91	512,46	13,52
0,172	2,50	183,62	530,45	14,53
0,172	2,50	162,32	521,28	13,06

Cuadro XXI. Efecto de la concentración de ácido acético y el tiempo del pretratamiento ácido, a temperatura ambiente, sobre diferentes características evaluadas a un gel elaborado con las proteínas extraídas.

Variables independientes (X)		Variables dependientes (Y)			
Concentración ácido acético (M)	Tiempo (h)	Fuerza F_g (g)	Temperatura gelificación T_g (°C)	Temperatura fusión T_f (°C)	pH
0,050	1,00	502,24	19,29	25,77	5,31
0,295	1,00	427,21	18,11	25,05	5,06
0,050	4,00	520,65	19,38	25,78	5,41
0,295	4,00	452,62	17,95	24,89	5,00
0,172	0,38	463,60	19,63	25,98	5,32
0,172	4,62	509,17	18,81	25,56	5,07
0,000	2,50	558,23	17,49	24,50	5,58
0,346	2,50	436,95	17,95	24,91	4,91
0,172	2,50	473,73	18,60	25,27	5,09
0,172	2,50	458,60	18,28	25,02	5,03
0,172	2,50	495,76	18,91	25,60	5,10

El coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2 -adj), la probabilidad del modelo (p), la probabilidad de falta de ajuste (p_{fa}) y el

comportamiento en la gráfica de la distribución de residuos de los modelos generados para las diferentes variables respuesta se observan en el Cuadro XXI.

Cuadro XXII. Resultados de los análisis de evaluación de los modelos de optimización del pretratamiento ácido generados para las diferentes variables respuesta.

Variables respuesta	P	p_{fa}	R²	R²-adj	Comportamiento gráfica de residuos
<i>Hidratación de la piel (%)</i>	0,0229	0,2376	0,88	0,76	Aleatorio
<i>Masa licor de pescado (g)</i>	0,0319	0,0950	0,86	0,73	Aleatorio
<i>Rendimiento extracción de proteínas (%)</i>	0,5132	0,5304	0,49	-0,01	Aleatorio
<i>Fuerza del gel F_g (g)</i>	0,0119	0,6490	0,91	0,82	Aleatorio
<i>Temperatura gelificación T_g (°C)</i>	0,2995	0,1661	0,62	0,24	Aleatorio
<i>Temperatura fusión T_f (°C)</i>	0,3057	0,2857	0,62	0,24	Aleatorio
<i>pH del gel</i>	0,0096	0,1230	0,92	0,84	Aleatorio

Los modelos para las variables respuesta rendimiento de extracción de proteínas y temperaturas de gelificación y fusión del gel tienen una probabilidad del modelo no significativa ($p > 0,05$). Además, tienen valores de R^2 y R^2 -adj bajos ($< 0,7$), por lo que se considera que los modelos generados no logran explicar la variación de los resultados obtenidos experimentalmente.

Los modelos obtenidos para las variables respuesta de hidratación de la piel, la masa de licor de pescado, la fuerza y el pH del gel tienen una probabilidad del modelo significativa ($p < 0,05$). Todos los modelos tienen R^2 mayores que 0,85 y falta de ajuste no significativa ($p > 0,05$), lo que indica que los modelos pueden describir la variación de los resultados experimentales. El R^2 -adj de los modelos de hidratación de la piel y de la masa de licor de pescado son menores a 0,85, pero están por encima del 0,70, valor mínimo sugerido para fines de optimización por Gutiérrez-Pulido y de la Vara-Salazar (2008). Para estas cuatro variables respuesta se generaron las ecuaciones de cada modelo considerando los coeficientes de los parámetros que son significativos ($p < 0,05$).

5.2.1.1 Hidratación de la piel y masa de licor de pescado

Para obtener la gelatina es necesario un pretratamiento que convierta el colágeno estructural en una forma más adecuada para su extracción. Esto implica la pérdida de su estructura nativa que da como resultado un colágeno hinchado (hidratado) (Giménez et al., 2005). Las materias primas son pretratadas en un medio ácido o alcalino para permitir la hinchazón del colágeno con el fin de aumentar la eficiencia de la extracción de gelatina durante la hidrólisis térmica (Ahmad et al., 2017). Los resultados obtenidos en los 11 tratamientos dan valores entre 7,53% y 183,62% para la hidratación de la piel y entre 380,38 g y 430,45 g de licor de pescado. Para estas dos variables respuesta los tres coeficientes de regresión significativos fueron los relacionados con el intercepto, la concentración del ácido acético (M) (Cn) y este factor al cuadrado (Cn²), generando las siguientes ecuaciones cuadráticas:

$$\text{Hidratación de la piel (\%)} = 34,18 + 1154,63 \cdot Cn - 2464,57 \cdot Cn^2 \quad (9)$$

$$\text{Masa de licor de pescado (g)} = 404,10 + 979,84 \cdot Cn - 2066,54 \cdot Cn^2 \quad (10)$$

La concentración de ácido acético afectó significativamente la hidratación de la piel de atún y la masa de licor extraída en términos lineales (de manera positiva) y cuadráticos (de manera negativa). El tiempo del pretratamiento ácido no afectó significativamente el resultado obtenido en estas variables. En las Figuras 20 y 21 se observa el efecto de la concentración del ácido acético respecto a la hidratación de la piel de atún y la masa de licor de pescado obtenida.

Se observa que las dos variables respuesta aumentan cuando la concentración del ácido aumenta entre 0 M y 0,21 M, de 0,21 M a 0,26 M se establece un rango máximo y cuando la concentración sigue aumentando después de 0,26 M las dos variables tienen a disminuir. Según Giménez et al. (2005), el tipo y la concentración del ácido utilizado tienen una fuerte influencia en las propiedades de hidratación y solubilidad del colágeno. Específicamente para el ácido acético, Gómez-Guillén et al. (2002)

indican que su alta capacidad de hidratación del colágeno se debe a su bajo peso molecular y su baja constante de ionización.

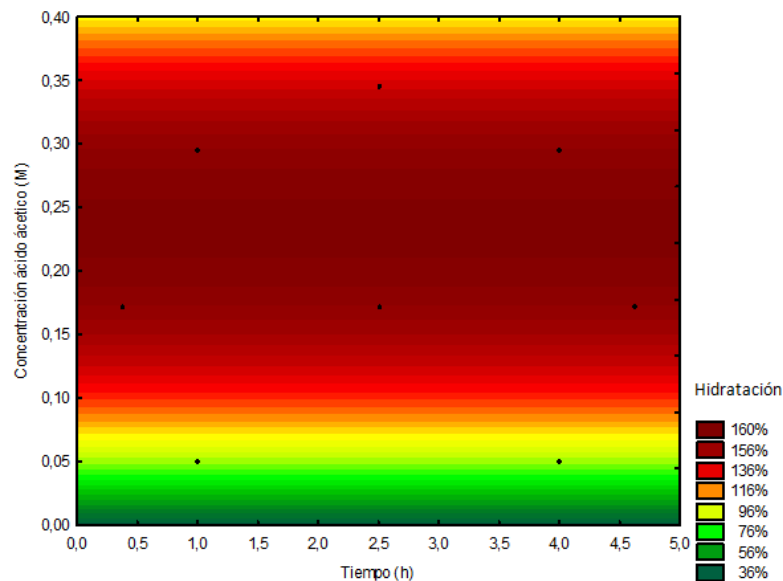


Figura 20. Efecto de la concentración del ácido acético sobre la hidratación de la piel de atún.

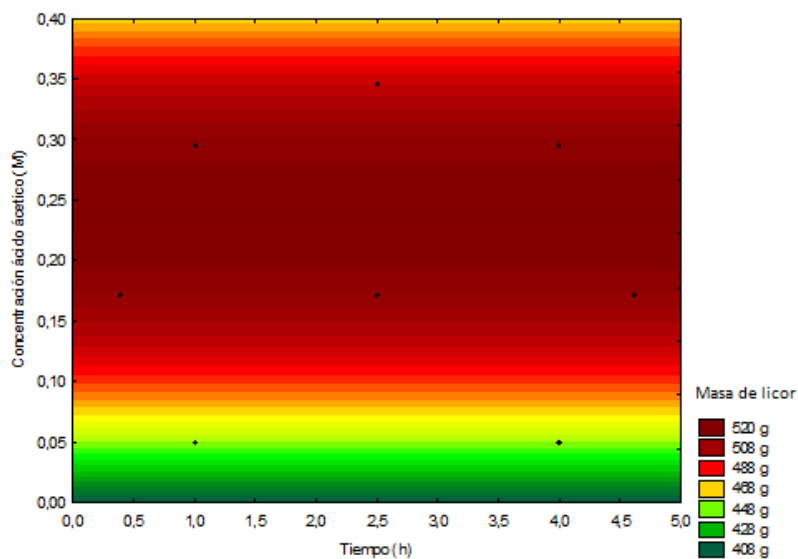


Figura 21. Efecto de la concentración del ácido acético sobre la masa de licor de pescado.

Según Gustavson (1956), la hidratación del colágeno se puede deber a dos mecanismos, la hidratación electrostática, que se da cuando el agua es retenida por fuerzas electrostáticas entre grupos polares cargados; o la hidratación liotrópica, que

se da por puentes de hidrógeno entre grupos polares no cargados y átomos negativos. Asghar y Henrickson (1982) indican que el efecto liotrópico de los ácidos carboxílicos es dominante en la hidratación del colágeno sobre el efecto electrostático. El ácido no ionizado actúa como agente de hidratación al competir con el grupo peptídico implicado en las uniones intermoleculares de las cadenas de proteínas, principalmente por el poder de enlace del hidrógeno del ácido. El aumento inicial en la hidratación de la piel de atún se puede asociar a la hidratación liotrópica, hasta llegar a la concentración donde se saturan las uniones intermoleculares disponibles y al aumentar la concentración de ácido se puede presentar un efecto electrostático negativo, disminuyendo la hidratación de la piel.

El comportamiento de la masa del licor de pescado obtenido, se puede explicar por su relación con la hidratación de la piel. Cuando se realiza la etapa de extracción del licor a una piel con mayor hidratación, el agua que hidrató la piel pasará al licor por el efecto de la temperatura y la hidrólisis del colágeno y, por lo tanto, se obtiene una mayor masa de licor. Esta afirmación se respalda estadísticamente cuando se evalúa el coeficiente de correlación de Pearson entre estas dos variables en los diferentes puntos experimentales ($n=11$). Se obtienen una correlación significativa ($p<0,05$), con un R de 0,98, lo que indica una alta correlación positiva, es decir, al aumentar el porcentaje de hidratación de la piel se aumenta la masa de licor extraída.

5.2.1.2 Fuerza y pH del gel

Los resultados obtenidos en los 11 tratamientos presentan valores de pH entre 4,91 y 5,58, normales para las gelatinas tipo A, cuyo pH se encuentra entre 3 y 6 (Kim et al., 2013; McClements, 2015; Wasswa et al., 2007). Para la fuerza del gel se obtuvieron resultados entre 436,95 g y 558,23 g. Para estas dos variables respuesta los dos coeficientes de regresión significativos fueron los relacionados con el intercepto y con el efecto lineal de la concentración del acético (M) (C_n), generando las siguientes ecuaciones:

$$\text{pH} = 5,45 - 1,64 * \text{Cn} \quad (11)$$

$$\text{Fuerza del gel (g)} = 537,04 - 321,03 * \text{Cn} \quad (12)$$

La concentración de ácido acético afectó significativamente el pH y la fuerza de gel de manera negativa. La representación gráfica de los dos modelos se observa en las Figuras 22 y 23, respectivamente.

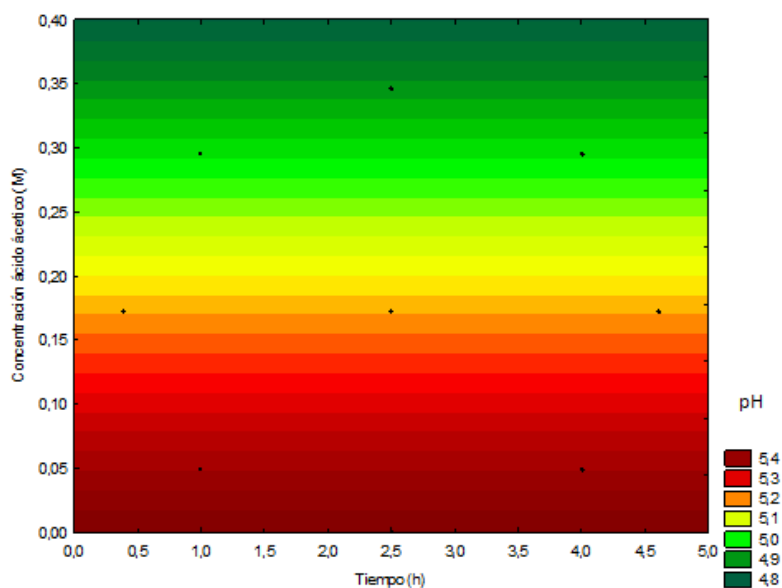


Figura 22. Efecto de la concentración del ácido acético sobre el pH de un gel (6,67% m/v) elaborado con la proteína extraída de la piel de atún.

Al aumentar la concentración de ácido acético, disminuye el pH del gel elaborado con las proteínas extraídas. Según Liu et al. (2015), la concentración del ácido acético determina el valor de pH del medio de extracción y, por lo tanto, regula la densidad de carga del colágeno, afectando la interacción electrostática y la estructura del colágeno.

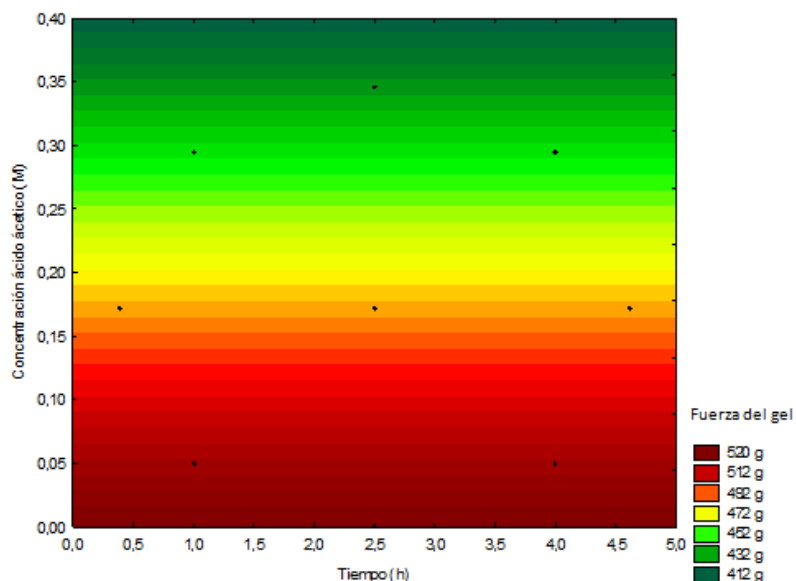


Figura 23. Efecto de la concentración del ácido acético sobre la fuerza del gel elaborado con la proteína extraída de la piel de atún.

La fuerza del gel también decrece con el aumento en la concentración del ácido acético. Nikoo et al. (2014) encontraron el mismo comportamiento en la gelatina extraída de la piel de esturión de Amur (*Acipenser schrenckii*). Zhou y Regenstein (2005) encontraron que para la gelatina de la piel del abadejo de Alaska la máxima fuerza de gel se da cuando se utilizó una concentración de ácido acético de 0,05 M; al aumentar más la concentración del ácido la fuerza del gel disminuyó significativamente. Díaz-Calderón et al. (2017) encontraron un resultado similar cuando evaluaron la fuerza del gel de gelatina de piel de salmón extraída con diferentes valores de pH, en donde la mayor fuerza de gel se presentó en la gelatina extraída con un valor de pH mayor.

Según Ahmad y Benjakul (2011), Díaz-Calderón et al. (2017), Giménez et al. (2005) y Gómez-Guillén et al. (2002), la distribución del peso molecular de las cadenas de gelatina y la relación entre cadenas α/β tienen una estrecha relación con la fuerza del gel. Sin embargo, al analizar la distribución del peso molecular de las proteínas obtenidas en los diferentes tratamientos (Figura 24), se observan perfiles de distribución similares, donde destaca la amplia distribución del tratamiento 5 en que la

concentración del ácido acético fue de 0,000 M, por lo tanto, la disminución de la fuerza del gel al aumentar la concentración del ácido acético no parece ser producto de cambios en la distribución de tamaños de las proteínas.

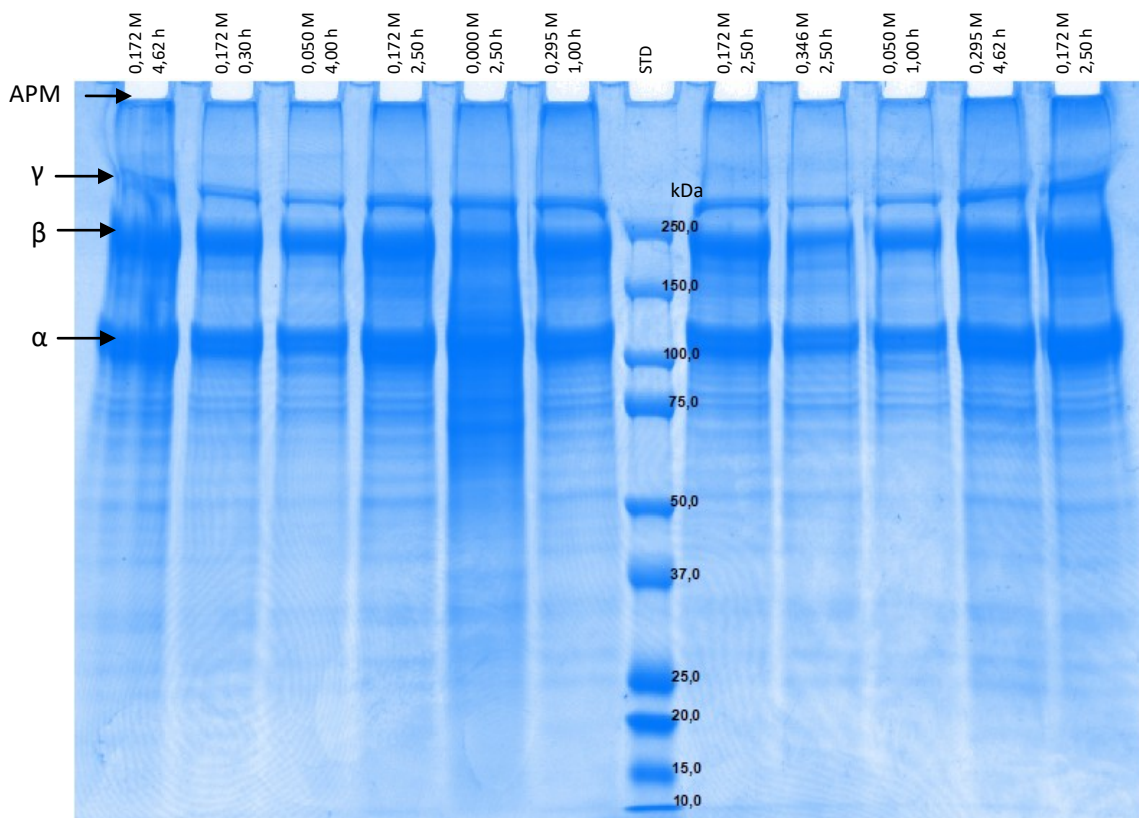


Figura 24. Electroforesis SDS-PAGE de las proteínas obtenidas de la piel de atún para la optimización del pretratamiento ácido. APM: Alto peso molecular; STD: Estándar.

Díaz-Calderón et al. (2017) observaron en sus resultados que la fuerza de gel no solo se rige por la distribución del peso molecular. A similar conclusión llegaron Eysturskarð et al. (2009a), indicando que diferencias en el punto isoeléctrico pueden conducir a una red de gel menos funcional y, consecuentemente, a valores de Bloom más bajos. Zhou y Regenstein (2005) y Gudmundsson y Hafsteinsson (1997) indican que la fuerza del gel depende del pH: se forman geles más compactos y rígidos cuando el pH de la gelatina se acerca a su punto isoeléctrico, donde las cadenas de proteínas estarán menos cargadas y, por lo tanto, estarían más cerca la una de la otra. Si se considera que la gelatina extraída en este estudio es del tipo A y, según Kim et al. (2013), McClements

(2015) y Wasswa et al. (2007), estas gelatinas tienen un punto isoeléctrico entre 7 y 9, al aumentar el pH en el rango de 4,91 a 5,58 se da un acercamiento al punto isoeléctrico y, por lo tanto, un aumento en la fuerza de gel. Los resultados del pH y la fuerza del gel de las gelatinas obtenidas en el diseño experimental de la optimización del pretratamiento ácido ($n = 11$) se correlacionan significativamente ($p < 0,05$), con un R de 0,79.

5.2.1.3 Optimización y verificación de los modelos generados

Tomando en cuenta los modelos que presentaron parámetros de ajustes adecuados y que la hidratación del colágeno es el principal objetivo del pretratamiento ácido, se escogió como variable respuesta de optimización la hidratación de la piel de atún. Bajo este razonamiento, considerando el modelo de regresión del porcentaje de hidratación de la piel (ver ecuación 8 y Figura 20) se estableció gráficamente como valor óptimo una concentración de ácido acético de 0,225 M. Como el tiempo no fue una variable significativa para los modelos, se decidió establecer su valor en su punto medio, 2,5 h, tiempo promedio utilizado en otras investigaciones (Benjakul et al., 2009; Gómez-Guillén et al., 2005; Jongjareonrak et al., 2010; Sarabia et al., 2000; Sinthusamran et al., 2014; Sinthusamran et al., 2015).

Con la concentración de ácido acético 0,225 M y un tiempo de 2,5 h se efectuaron 3 ensayos adicionales (tres repeticiones) con el fin de realizar la verificación de los resultados obtenidos respecto a los resultados predichos por los modelos para las variables respuesta hidratación de la piel, masa de licor de pescado, la fuerza y el pH de un gel (6,67% m/v) elaborado con el extracto proteico liofilizado.

En el Cuadro XXII se muestran los valores de las variables respuesta predichas por los modelos, los valores obtenidos experimentalmente a nivel de laboratorio y el porcentaje de error asociado, para la concentración óptima y el tiempo elegido en la etapa del pretratamiento ácido para la extracción del licor de pescado. Se observa que los resultados experimentales para las variables respuesta hidratación de piel, masa de

licor y pH se encontraron dentro de los intervalos de los valores predichos por los modelos generados.

Cuadro XXIII. Valores de las variables respuesta predichas y obtenidas para las condiciones óptimas de la etapa del pretratamiento ácido en la extracción del licor de pescado a nivel de laboratorio¹ y el porcentaje de error obtenido.

Variables respuesta	Valor predicho ²	Valor obtenido ³	Porcentaje de error (%)
Hidratación de la piel (%)	169 ± 22	145 ± 6	14,2
Masa de licor de pescado (g)	520 ± 21	507 ± 6	2,5
Fuerza del gel F_g (g)	465 ± 14	579 ± 17	24,5
pH del gel	5,08 ± 0,08	5,19 ± 0,02	2,2

¹Condiciones del pretratamiento ácido: Concentración de ácido acético = 0,225 M y tiempo = 2,5 h.

²Valores predichos por el modelo ± intervalo de confianza (nivel de confianza del 95%).

³Promedio ± intervalo de confianza (nivel de confianza de 95%, n = 3).

Los resultados indican que se pudo modelar los factores evaluados (concentración del ácido acético y tiempo del pretratamiento) ya que los resultados obtenidos en las variables respuesta: hidratación de la piel, masa de licor de pescado y el pH del gel, se encuentran dentro de los predichos (considerando los intervalos de confianza). Además, los porcentajes de error obtenidos se consideran adecuados cuando se comparan con los porcentajes de error obtenidos y aceptados (4,76% al 17,68%) en otras investigaciones que utilizan la metodología de superficie de respuesta para realizar optimizaciones (Owolabi et al., 2018; Safari et al., 2018; Unal, 2016). Solamente se presentó una desviación para los valores de la fuerza de gel, que se puede asociar a los altos valores de pH del gel que se presentaron. Como se mencionó anteriormente la fuerza de gel tiende a aumentar cuando el pH se acerca al valor del punto isoeléctrico de las proteínas.

5.2.2 Optimización de la etapa de extracción

Se optimizó la etapa de extracción respecto a dos factores: el tiempo y la temperatura, utilizando la metodología de superficie de respuesta empleando un DCCR. Según Kittiphattanabawon et al. (2010), las condiciones de la extracción de la gelatina,

especialmente la temperatura y el tiempo de extracción, deben optimizarse para evitar la degradación de las moléculas de gelatina. La optimización se realizó en función del rendimiento de extracción de las proteínas en el licor de pescado, la fuerza y las temperaturas de gelificación y fusión del gel. También se evaluó la distribución de tamaño de las proteínas extraídas.

Al aplicar el DCCR se obtiene un polinomio de segundo grado, como se observa a continuación:

$$Y = c_0 + c_1X_1 + c_2X_2 + c_3X_1^2 + c_4X_2^2 + c_4X_1X_2 \quad (13)$$

El modelo se ajusta a los resultados obtenidos en las variables respuesta (ver Cuadro XXIII), donde Y representa el valor de la variable dependiente (respuesta), c_n representan los coeficientes de regresión del modelo y X_1 y X_2 el valor de las variables independientes, en este caso la temperatura y el tiempo de la etapa de extracción.

Cuadro XXIV. Efecto de la temperatura y del tiempo de la etapa de extracción sobre el rendimiento de extracción de proteínas y diferentes características evaluadas a un gel elaborado con estas proteínas (6,67% m/v).

Variables independientes (X)		Variables dependientes (Y)			
Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Rendimiento de extracción de proteínas (%)	Temperatura gelificación T_g (°C)	Temperatura fusión T_f (°C)	Fuerza F_g (g)
62	0,38	10,66	19,81	26,43	589,00
80	4,00	12,00	15,33	22,01	461,39
45	1,00	10,66	18,94	25,45	612,90
80	1,00	12,00	17,82	24,55	543,89
62	2,50	11,33	19,15	25,75	575,42
62	2,50	13,33	19,96	25,15	560,65
62	4,62	14,00	18,58	24,99	620,00
62	2,50	13,33	18,89	25,43	622,11
87	2,50	12,66	13,76	20,91	425,72
45	4,00	12,00	18,59	24,98	666,39
37	2,50	11,33	18,49	25,15	632,85

Los parámetros de evaluación: el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2 -adj), la probabilidad del modelo (p), la probabilidad de

falta de ajuste (p_{fa}) y el comportamiento en la gráfica de la distribución de residuos de los modelos generados para las diferentes variables respuesta se observan en el Cuadro XXIV.

Cuadro XXV. Resultados de los análisis de evaluación de los modelos de optimización de la etapa de extracción generados para las diferentes variables respuesta.

Variables respuesta	p	P_{fa}	R²	R²-adj	Comportamiento gráfica de residuos
<i>Rendimiento extracción de proteínas (%)</i>	0,2970	0,7232	0,62	0,25	Aleatorio
<i>Fuerza del gel F_g (g)</i>	0,0022	0,5157	0,96	0,91	Aleatorio
<i>Temperatura gelificación T_g (°C)</i>	0,0014	0,2543	0,96	0,93	Aleatorio
<i>Temperatura fusión T_f (°C)</i>	0,0031	0,8683	0,95	0,90	Aleatorio

El modelo para la variable respuesta rendimiento de extracción de proteínas tiene una probabilidad del modelo no significativa ($p > 0,05$). Además tiene valores de R^2 y R^2 -adj bajos ($< 0,7$) por lo que se considera que el modelo generado no logra explicar la variación de los resultados obtenidos experimentalmente para esta variable.

Los modelos obtenidos para las variables respuesta de la fuerza y las temperaturas de gelificación y fusión del gel tienen una probabilidad del modelo significativa ($p < 0,05$). Todos los modelos tiene R^2 y R^2 -adj mayores a 0,90, y falta de ajuste no significativa ($p > 0,05$), lo que indica que los modelos pueden describir la variación de los resultados experimentales. Según Soto (2014), valores de R^2 y R^2 -adj similares indican que todos los términos utilizados en los modelos fueron necesarios para construir los modelos correctos. Se generaron las ecuaciones de cada modelo considerando los coeficientes de los parámetros que son significativos ($p < 0,05$).

5.2.2.1 Temperaturas de gelificación y fusión y fuerza de gel

El tratamiento térmico impartido durante la extracción desestabiliza la triple hélice del colágeno, lo que produce la transición de hélice a espiral y la conversión en gelatina soluble en agua por el rompimiento de puentes de hidrógeno y los enlaces covalentes inter e intra moleculares (Gómez-Guillén et al., 2002). Los resultados obtenidos en los

11 tratamientos muestran valores de temperatura de gelificación (T_g) entre 13,76 °C y 19,96 °C, de temperatura de fusión (T_f) entre 20,91 °C y 26, 43 °C y de fuerza de gel entre 425,72 g y 666,39 g.

Para las temperaturas de gelificación y fusión, los cuatro coeficientes de regresión significativos fueron los relacionados con el intercepto, el tiempo (t), la temperatura (T) y este factor al cuadrado (T^2), generando las siguientes ecuaciones cuadráticas:

$$T_g (\text{°C}) = 5,657 - 0,382*t + 0,546*T - 0,005*T^2 \quad (14)$$

$$T_f (\text{°C}) = 15,385 - 0,421*t + 0,430*T - 0,004*T^2 \quad (15)$$

Para la fuerza de gel (F_g), los cuatro coeficientes de regresión significativos fueron los relacionados con el intercepto, la temperatura (T), la temperatura al cuadrado (T^2) y la interacción entre el tiempo y la temperatura ($t*T$), generando la siguiente ecuación cuadrática:

$$F_g (\text{g}) = 472,56 + 8,04*T - 0,10*T^2 - 0,03*t*T \quad (16)$$

El tiempo de la extracción afectó significativamente y en términos lineales (negativamente) las temperaturas de gelificación y de fusión de la gelatina de piel de atún extraída. La temperatura de extracción afectó significativamente en términos lineales (positivamente) y cuadráticos (negativamente) las temperaturas de gelificación y de fusión de la gelatina de piel de atún extraída. En las Figuras 25 y 26 se observa el efecto del tiempo y la temperatura de extracción sobre las temperaturas de gelificación y fusión.

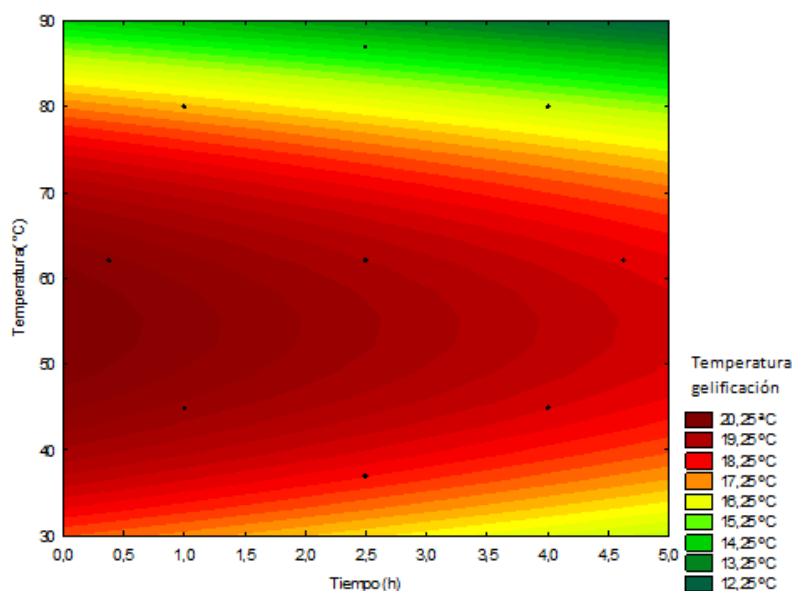


Figura 25. Efecto del tiempo y de la temperatura de extracción sobre la temperatura de gelificación de la gelatina de piel de atún.

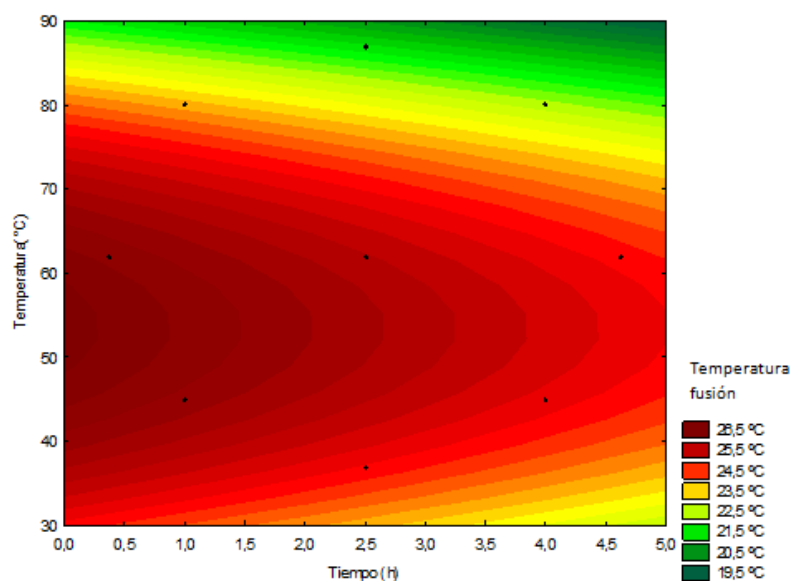


Figura 26. Efecto del tiempo y de la temperatura de extracción sobre la temperatura de fusión de la gelatina de piel de atún.

La temperatura de extracción afectó significativamente la fuerza del gel de la gelatina de piel de atún extraída en términos lineales (positivamente) y cuadráticos (negativamente). El tiempo de la extracción no tuvo un efecto lineal o cuadrático significativo sobre la fuerza del gel, pero sí presenta interacción negativa con la

temperatura de extracción sobre la fuerza del gel de la gelatina de piel de atún extraída. En la Figura 27 se observa el efecto del tiempo y la temperatura de extracción sobre la fuerza de gel.

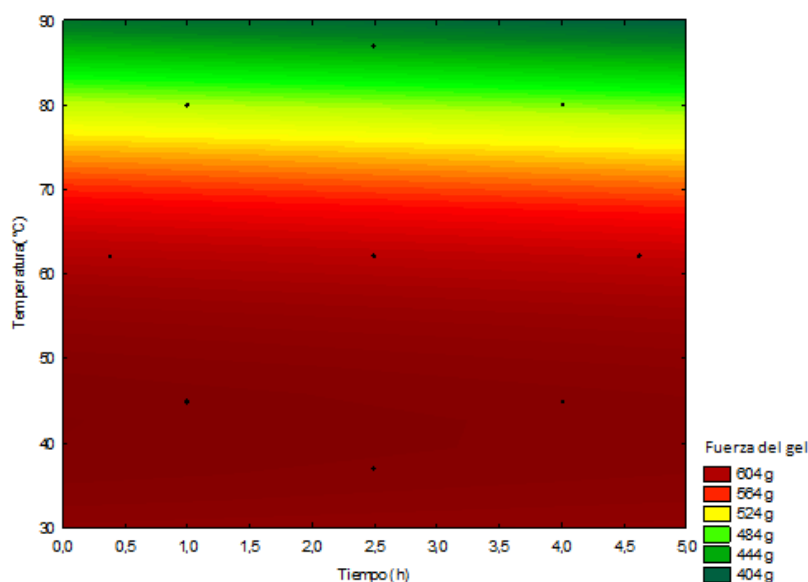


Figura 27. Efecto del tiempo y de la temperatura de extracción sobre la fuerza del gel elaborado con la gelatina extraída de la piel de atún.

Según Kołodziejska et al. (2008), el tiempo y la temperatura de extracción influyen en la longitud de las cadenas polipeptídicas formadas y, por lo tanto, en las propiedades funcionales de la gelatina. La hidrólisis de las cadenas de colágeno se da por acción de la temperatura. Al aumentar la temperatura de extracción de 37 °C a 55 °C se da un incremento de las temperaturas de gelificación y fusión. Al haber más energía se aumenta la hidrólisis del colágeno, obteniendo una alta proporción de cadenas α , β y γ , sin obtener péptidos de bajo peso molecular por una hidrólisis excesiva. Después de los 55 °C, al aumentar las temperaturas de extracción, disminuyen las temperaturas de gelificación y fusión, producto de una degradación excesiva de las cadenas de gelatina, que se evidencia por la presencia de proteínas de pesos moleculares menores a 100 kDa, más pronunciados en las extracciones a 80 °C y 87 °C (ver Figura 28).

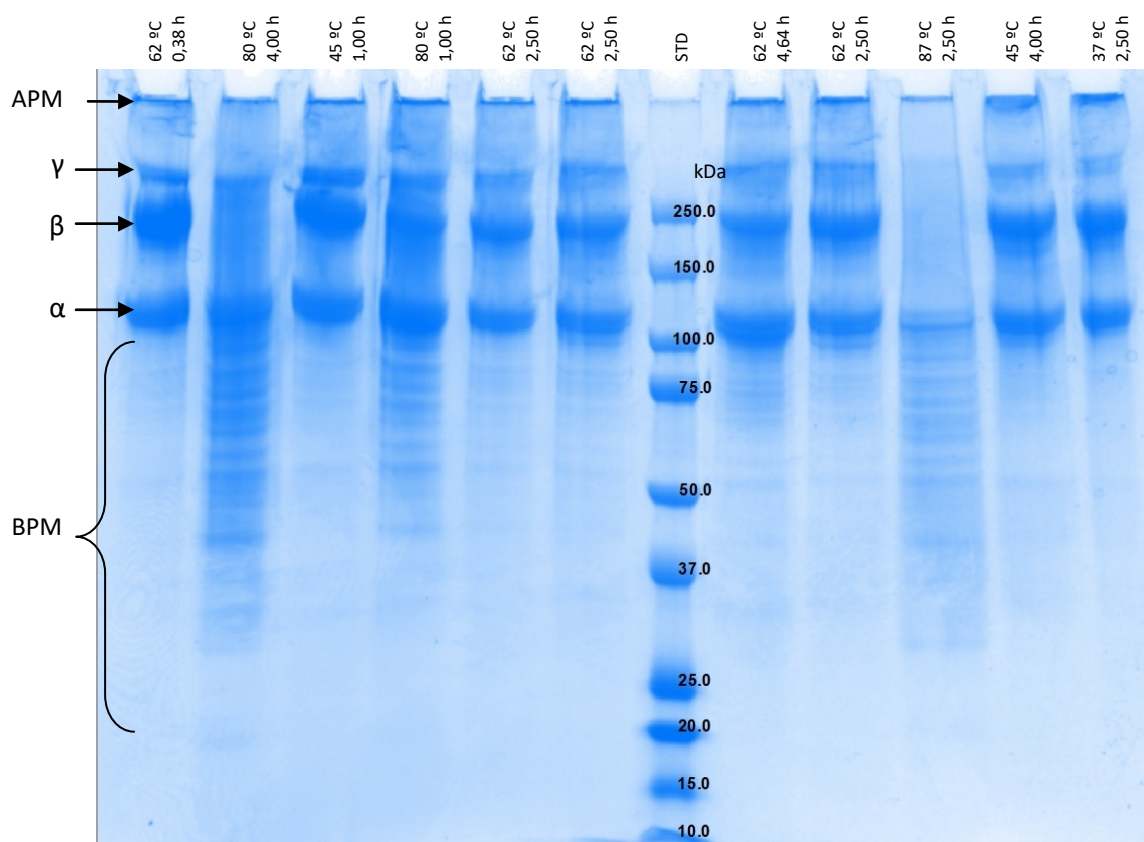


Figura 28. Electroforesis SDS-PAGE de las proteínas obtenidas de la piel de atún para la optimización de la etapa de extracción. APM: alto peso molecular; STD: Estándar; BPM: bajo peso molecular.

Respecto al tiempo de extracción se observa que, al aumentar, se disminuyen las temperaturas de gelificación y fusión de las gelatinas extraídas, también por el aumento en la hidrólisis de las proteínas, lo cual queda evidente en la Figura 28, donde se observa mayor proporción de proteínas de bajo peso molecular al aumentar el tiempo, comparando extracciones a la misma temperatura.

Respecto a la fuerza de gel, el comportamiento respecto al tiempo y la temperatura de extracción es similar al de las temperaturas de gelificación y fusión, aumentando en el rango de los 37 °C a los 47 °C, y disminuyendo al aumentar más la temperatura. La fuerza del gel también se reduce al aumentar el tiempo. Similar resultado obtuvieron Kaewruang et al. (2013a) en gelatina extraída del pez unicornio “jacket de cuero”

(*Aluterus monoceros*). Estos autores reportan que al aumentar la temperatura de extracción de 45 °C a 65 °C, aumenta la fuerza del gel y disminuye al aumentar la temperatura de 65 °C a 75 °C. También se reduce la fuerza del gel al aumentar el tiempo de extracción. Los investigadores concluyeron que la variación se debe a diferencias en la distribución del peso molecular y la agregación entre las moléculas de gelatina.

La disminución de la fuerza del gel por el aumento de la temperatura y el tiempo de extracción se encontró en otros estudios de gelatina de subproductos pesqueros, Kittiphattanabawon et al. (2010) en piel de tiburón bambú marrón (*Chiloscyllium punctatum*) y de tiburón punta negra (*Carcharhinus limbatus*), Kittiphattanabawon et al. (2016) en piel de pez payazo "featherback" (*Chitala ornata*), Nagarajan et al. (2012) en piel de calamar (*Loligo formosana*), Sinthusamran et al. (2014) en piel de lubina (*Lates calcarifer*) y Cho et al. (2006) en piel de raya (*Raja kenoei*), todos asocian este comportamiento a una mayor degradación de las gelatinas.

5.2.2.2 Optimización y verificación de los modelos generados

La fuerza del gel y la temperatura de fusión son las propiedades más importantes de la gelatina, definen su interés comercial y sus potenciales usos (Karim y Bhat, 2009; Lin et al., 2017). Respecto a la gelatina de piel de atún aleta amarilla, Cho et al. (2005) determinaron que tiene un alto potencial en comparación con otras gelatinas de pescado, especialmente por su alta fuerza de gel; sin embargo, se deben mejorar su temperatura de gelificación y fusión para que pueda competir con las gelatinas obtenidas de mamíferos. Por esta razón se decidió optimizar el tratamiento de extracción para obtener las mayores temperaturas de gelificación y fusión posibles.

La optimización se realizó utilizando la función de deseabilidad. Según Gutiérrez-Pulido y de la Vara-Salazar (2008), el procedimiento consiste en definir una función en el espacio de factores que estima la deseabilidad global (DG) del producto en cada punto; de esta forma, convierte el problema de optimización multivariado en un problema de

optimización univariado. Si se logra maximizar la deseabilidad de todas las variables se obtiene un 1, si no se logra se obtendrá un valor entre 0 y 1. En la Figura 29 se muestra la representación gráfica de la deseabilidad.

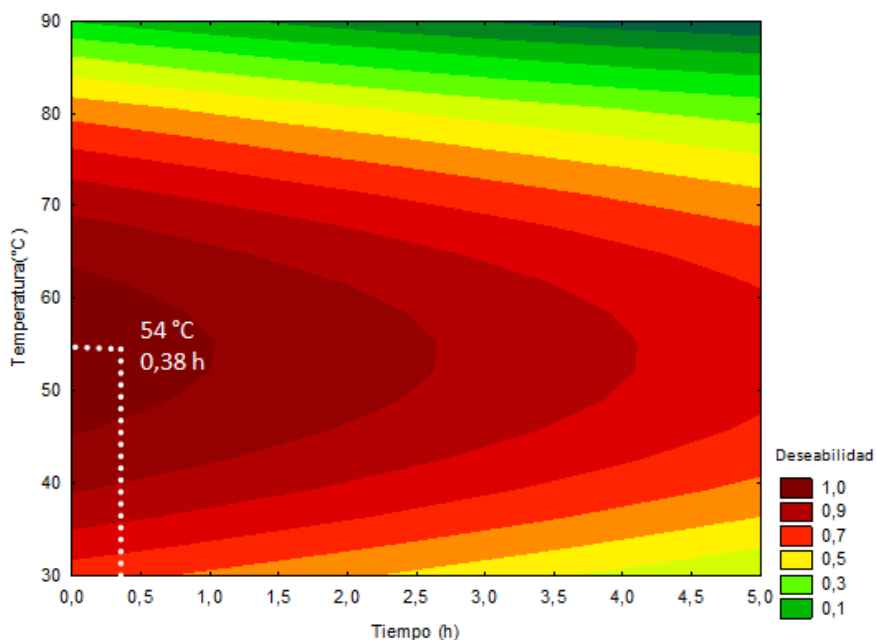


Figura 29. Deseabilidad en función del tiempo y de la temperatura de extracción para la maximización de las temperaturas de gelificación y fusión de la gelatina extraída de la piel de atún.

El punto óptimo que arrojó el modeló fue de un tiempo de extracción 0,38 h y una temperatura de extracción 54,0 °C, para una deseabilidad de 0,97. Para verificar el resultado de la función de deseabilidad, se realizaron 3 repeticiones experimentales con las condiciones óptimas de la etapa de extracción, con el fin de comparar los resultados obtenidos respecto a los resultados predichos por los modelos para las variables respuesta temperaturas de gelificación y fusión y fuerza de un gel elaborado con el extracto proteico liofilizado.

En el Cuadro XXV se muestran los valores de las variables respuesta predichas por los modelos, los valores obtenidos experimentalmente a nivel de laboratorio y el porcentaje de error asociado, para las condiciones óptimas de la etapa de extracción.

Cuadro XXVI. Valores de las variables respuesta predichas y obtenidas para las condiciones óptimas de la etapa del pretratamiento ácido en la extracción del licor de pescado a nivel de laboratorio¹ y el porcentaje de error obtenido.

Variables respuesta	Valor predicho²	Valor obtenido³	Porcentaje de error (%)
<i>Fuerza del gel F_g (g)</i>	599 ± 27	558 ± 42	6,8
<i>Temperatura gelificación T_g (°C)</i>	20 ± 1	19,0 ± 0,4	6,9
<i>Temperatura fusión T_f (°C)</i>	26,7 ± 0,8	25,6 ± 0,3	4,1

¹Condiciones de la etapa de extracción: Temperatura = 54 °C y tiempo = 2,5 h.

²Valores predichos por el modelo ± intervalo de confianza (nivel de confianza del 95%).

³Promedio ± intervalo de confianza (nivel de confianza de 95%, n = 3).

Los resultados experimentales se encontraron dentro de los intervalos de los valores predichos por los modelos generados. Además, los porcentajes de error obtenidos se consideran adecuados, cuando se comparan con los porcentajes de error obtenidos y aceptados (4,76% al 17,68%) en otras investigaciones que utilizan la metodología de superficie de respuesta para realizar optimizaciones (Owolabi et al., 2018; Safari et al., 2018; Unal, 2016). Esto indica que se pudo modelar y optimizar los factores evaluados (temperatura y tiempo de la etapa de extracción).

Otros estudios en gelatina de piel de atún aleta amarilla presentaron similares temperaturas de gelificación o menores, Ninan et al. (2013) (18,80 °C ± 0,14 °C), Yoo et al. (2008) (18,8 °C) y Cho et al. (2005) (18,7 °C); y menores temperaturas de fusión Pranoto et al. (2011) (20,33 °C ± 0,14 °C), Yoo et al. (2008) (24,0 °C) y Cho et al. (2005) (24,3 °C). Otros estudios obtuvieron temperaturas de fusión mayores: Ninan et al. (2013) (29,27 °C ± 0,06 °C), Karayannakidis et al. (2014) (28,4 °C) y Karayannakidis y Zotos (2015) (26,9 °C ± 0,2 °C). Estos estudios también midieron la fuerza de gel de las gelatinas obtenidas, pero las dimensiones del gel y la temperatura a la que realizaron las mediciones son diferentes a las de este estudio, lo que hace que los resultados no sean comparables.

5.3 Escalamiento, a nivel piloto, del proceso de extracción de proteínas para obtener el licor de pescado que se procesará con las membranas

El escalamiento se entiende generalmente como el procedimiento de transferencia de los resultados de la investigación y de desarrollos obtenidos a escala de laboratorio a escala de planta piloto y finalmente a la escala de producción (Levin, 2016). Definidas las condiciones óptimas del proceso de extracción del licor de pescado a escala de laboratorio, se procedió a escalar el proceso a nivel de planta piloto para poder producir la cantidad de licor de pescado que permitiera realizar un fraccionamiento en serie utilizando 4 membranas. Según Mittal (2017), el escalamiento del proceso es clave para demostrar la capacidad de producción e implica trasladar un producto de investigación y desarrollo a una producción mayor.

Según las operaciones unitarias definidas a nivel de laboratorio, se seleccionaron los equipos de planta piloto que permitían realizar un proceso similar. Sin embargo, al no ser equipos que tienen las mismas dimensiones y los mismos principios de funcionamiento, el proceso varía y esto podría afectar las características del producto final. Se debe conocer el proceso para identificar y entender las fuentes de variabilidad, administrar la variabilidad del proceso y predecir su impacto en el producto. Durante el escalamiento, el diseño de los equipos tiene un impacto importante (Parikh, 2017). La evaluación del escalamiento se realizó respecto a tres componentes: los rendimientos de las diferentes etapas de proceso, la composición de la materia prima, el producto final y los subproductos, y las propiedades de gelificación de la gelatina extraída.

5.3.1 Comparación de los rendimientos de las diferentes etapas y de la composición de las salidas del proceso de extracción de licor de pescado.

Se realizaron los procesos a escala de laboratorio y planta piloto, por triplicado, siguiendo las condiciones de proceso y utilizando los equipos que se detallan en las Figuras 16 y 17. Se calcularon los rendimientos de las diferentes etapas del proceso,

respecto a la masa de piel inicial. Los resultados se observan en el Cuadro XXVI. Además, se tomaron muestras de la piel, los subproductos y los licores de pescado obtenidos y se analizó su composición. Los resultados se observan en el Cuadro XXVII.

Cuadro XXVII. Rendimientos de cada etapa del proceso de extracción de licor de pescado según la escala aplicada.

Escala	Rendimiento (%) ^{1,2}					
	Pretratamiento ácido	Lavado 1	Lavado 2	Lavado 3	Extracción	Centrifugación
Laboratorio	175 ± 10	174 ± 10	183 ± 11	196 ± 15a	447 ± 33	434 ± 35a
Planta Piloto	164 ± 10	161 ± 7	170 ± 1	168 ± 10b	409 ± 14	361 ± 9b

¹ Valores reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3, nivel de confianza del 95%).

² Promedios en la misma columna con una letra diferente son significativamente diferentes (p < 0,05).

Cuadro XXVIII. Contenido de humedad, proteína, grasa, ceniza y pH de la piel de atún, el licor de pescado y los subproductos del proceso de extracción de licor de pescado a escala de laboratorio y de planta piloto.

Fracción	Humedad ^{1,2} (g / 100 g)		Proteína ^{1,2} (g / 100 g)		Grasa ^{1,2} (g / 100 g)		Ceniza ^{1,2} (g / 100 g)		pH ^{1,2,3}	
	L	PP	L	PP	L	PP	L	PP	L	PP
Piel inicial	58 ± 3	60,8 ± 0,7	28 ± 5	25,8 ± 0,9	6 ± 1	5 ± 1	3,5 ± 0,5	3,5 ± 0,7	5,9 ± 0,1	5,91 ± 0,07
Solución ácida	99,0 ± 0,5	99,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,02 ± 0,04	0,27 ± 0,07	0,26 ± 0,02	4,5 ± 0,1	4,6 ± 0,2
Agua de lavado 1	99,65 ± 0,09	99,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,00 ± 0,01	0,00 ± 0,01	0,07 ± 0,07	0,11 ± 0,03	4,57 ± 0,07	4,6 ± 0,1
Agua de lavado 2	99,89 ± 0,03	99,87 ± 0,06	0,10 ± 0,01	0,2 ± 0,1	0,01 ± 0,02	0,1 ± 0,1	0,02 ± 0,02	0,05 ± 0,00	4,57 ± 0,06b	4,8 ± 0,1a
Agua de lavado 3	99,93 ± 0,06	99,93 ± 0,02	0,09 ± 0,04	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,04	0,1 ± 0,1	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	4,57 ± 0,09b	4,8 ± 0,1a
Piel final	73 ± 5	67 ± 2	15 ± 4b	23 ± 3a	3 ± 1	5 ± 1	3 ± 2	2,5 ± 0,7	5,47 ± 0,08b	5,65 ± 0,07a
Lodos	NA	98 ± 2	NA	2 ± 2	NA	0,7 ± 0,7	NA	0,01 ± 0,01	NA	5,0 ± 0,1
Licor de pescado	99 ± 1	99 ± 1	1 ± 1	3 ± 2	0,01 ± 0,03	0,05 ± 0,05	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	4,9 ± 0,2	5,1 ± 0,2

¹ Valores reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3, nivel de confianza del 95%).

² L: Laboratorio, PP: Planta piloto, NA: No aplica.

³ Promedios de cada tratamiento con una letra diferente son significativamente diferentes (p < 0,05).

Los principales cambios que se presentaron al escalar el proceso de extracción de licor de pescado de la piel de atún se relacionan con los equipos utilizados y los tiempos de separación. Específicamente en las etapas del pretratamiento ácido, los lavados y la extracción se utilizó una marmita y se realizó una agitación manual con un agitador

tipo paleta. Según Scott et al. (2017), las operaciones de transferencia de calor y de mezclado, muy comunes en procesos alimentarios, dependen en gran medida de la relación entre el área de contacto y el volumen. Esta relación normalmente cambia en el escalamiento y este cambio provoca que se den diferencias en la mezcla de los productos y la transferencia de calor, en mayor medida en materiales sensibles a la temperatura y difíciles de mezclar. Sin embargo, la composición de los subproductos de estas etapas de proceso y sus rendimientos, a excepción de la piel final y los lavados 2 y 3, no presentan diferencias significativas según la escala de extracción.

Las diferencias entre el pH de las aguas de lavado 2 y 3 y del rendimiento de la etapa del lavado 3 se pueden deber al equipo utilizado (coladores en serie) y el tiempo de separación de la piel, de la solución ácida, de las aguas de lavado y del licor de pescado a escala de planta piloto. El tamaño de los coladores y el volumen a separar provocó que estas filtraciones tomaran entre 40 y 55 minutos, mientras a nivel de laboratorio solo tomaron 5 minutos. Este aumento de tiempo pudo provocar un aumento en el lavado del ácido en el primer proceso que se ve reflejado en un pH mayor en las aguas de los lavados 2 y 3. Como se mencionó en el objetivo anterior, un aumento en el pH de la piel hidratada hace que se acerque más al punto isoeléctrico de las proteínas, provocando una menor hidratación y, por lo tanto, un rendimiento del lavado 3 menor. La diferencia en el contenido de proteína de la piel final se puede deber a la variabilidad del producto, que puede dificultar la toma de muestras representativas. Según Mittal (2017), los problemas del escalamiento normalmente se deben a los aumentos del lote, la complejidad del diseño de los equipos y a los incrementos de los tiempos de proceso.

Otro cambio importante durante el escalamiento fue el equipo utilizado para la separación de los sólidos insolubles en suspensión por centrifugación. A nivel de planta piloto se utilizó una clarificadora centrífuga (Westfalia Separador, modelo AG Oelde, Alemania), que funciona bajo el mismo principio que el equipo de laboratorio (separación por diferencias de densidad). Sin embargo, este equipo almacena los

sólidos en su interior y mantiene un volumen muerto de licor de pescado, que no se puede recuperar y se considera parte del subproducto denominado lodos. Esto hace que el rendimiento del proceso de centrifugación del licor de pescado sea significativamente menor a nivel de escala piloto. También se espera que su composición varíe respecto a los lodos obtenidos a nivel de laboratorio, pero la masa obtenida en el laboratorio fue muy pequeña, lo que no permitió analizar su composición.

5.3.2 Comparación de las propiedades de gelificación de las gelatinas obtenidas.

Con el fin de evaluar el efecto de las diferencias de los procesos según la escala, mencionadas en la sección 5.3.1, sobre las propiedades de gelificación de las gelatinas obtenidas, se liofilizó una fracción de los licores de pescado obtenidos y se prepararon geles al 6,67% (m/v). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 30. Además, se evaluó la distribución de tamaño de las proteínas extraídas en cada réplica, según la escala del proceso. Los resultados se muestran en la Figura 31.

Según Levin (2016), se pueden encontrar numerosos problemas en el escalamiento, que pueden producir cambios en la calidad del producto; es por esto que el escalamiento debe ser parte importante del desarrollo. En la Figura 30 se observa cómo no hay diferencias significativas entre la fuerza de gel y la temperatura de fusión de las gelatinas extraídas a diferentes escalas. Sólo se obtiene una diferencia significativa en la temperatura de gelificación donde se presenta una temperatura ligeramente menor (0,8 °C) en la gelatina obtenida a escala de planta piloto. Estos resultados indican que, a pesar de las diferencias en dimensiones y características de los equipos utilizados y del aumento en los tiempos de separación a escala de planta piloto, las propiedades de gelificación no se ven afectadas o se afectan levemente, manteniendo la calidad de la gelatina producida bajo las condiciones óptimas definidas a nivel de laboratorio.

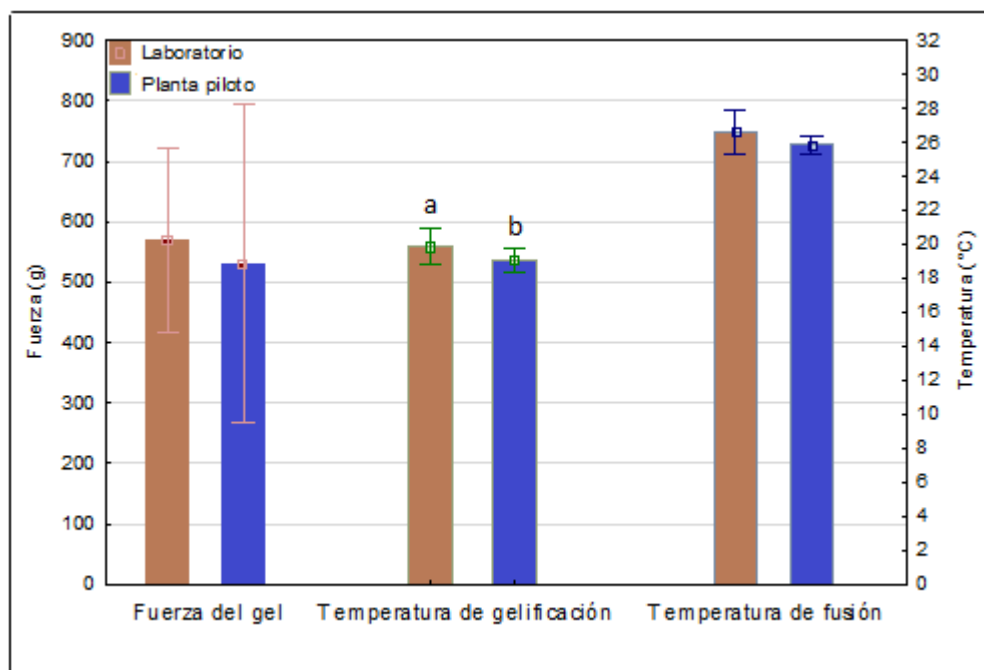


Figura 30. Evaluación del efecto de la escala del proceso sobre la fuerza de gel y temperaturas de gelificación y fusión de las gelatinas obtenidas (barras indican intervalo de confianza al 95%, $n = 3$). Barras con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

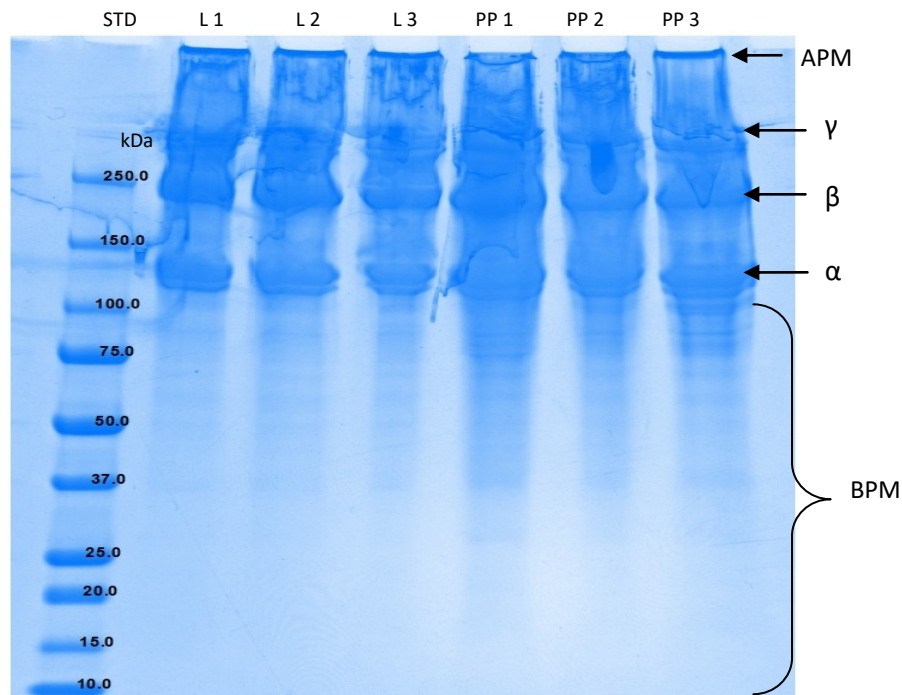


Figura 31. Electroforesis SDS-PAGE de las proteínas obtenidas de la piel de atún según la escala del proceso (L: laboratorio, PP: Planta piloto). APM: alto peso molecular; STD: Estándar; BPM: bajo peso molecular.

Al observar la distribución de tamaño de las proteínas en la Figura 31, se obtiene que las proteínas extraídas a escala de planta piloto tienen una proporción de proteínas de bajo peso molecular mayor respecto a las proteínas extraídas a nivel de laboratorio. La mayor proporción de proteínas de bajo peso molecular se debe al mayor tiempo de contacto con el agua caliente en el proceso de separación del licor de pescado y la piel final. Al ser mayor que el tiempo que dura la separación a escala de laboratorio, produce una mayor hidrólisis de las proteínas y, por lo tanto, pesos moleculares menores; sin embargo, parece no ser una hidrólisis que afecte las propiedades de gelificación.

La variabilidad se debe a la mayor complejidad del proceso de extracción en la planta piloto. Esta variabilidad hace que los resultados de las propiedades de gelificación, en especial en la fuerza de gel, tengan un intervalo de confianza mayor respecto al obtenido en las proteínas extraídas en el laboratorio, lo que dificulta detectar diferencias entre los procesos. Según Scott et al. (2017), los alimentos son una mezcla compleja de sistemas químicos y físicos que interactúan. A medida que los sistemas crecen, las formas en que funcionan pueden cambiar y, por lo tanto, el escalamiento de procesos no es sencillo y puede requerir múltiples intentos de prueba y error.

5.4 Evaluación de diferentes tecnologías de membrana para el fraccionamiento de proteínas extraídas del licor de pescado

Las separaciones por membranas son técnicas útiles para extraer, concentrar, purificar o fraccionar moléculas marinas valiosas de efluentes, desechos o subproductos de la industria pesquera (Afonso y Bórquez, 2002; Bourseau et al., 2009). El desarrollo de técnicas para la recuperación y la utilización de proteínas de subproductos animales ha ganado considerable interés en los últimos años. Sin embargo, solo unos pocos autores investigaron las propiedades tecnofuncionales de los extractos obtenidos (Darine et al., 2010).

Las propiedades de gelificación de las gelatinas dependen, entre otros factores, del peso molecular de las cadenas proteicas que las componen (Haug et al., 2004; Karim y Bhat, 2009; Kim et al., 2013). Por esta razón se planteó realizar un fraccionamiento de las proteínas del licor de piel de atún, utilizando membranas de MF y UF, para obtener fracciones con características de gelificación diferenciadas de acuerdo con las distribuciones de peso molecular obtenidas.

Según Simon et al. (2002), un beneficio potencial del proceso de UF es el estrechamiento de la distribución de masa molecular de la gelatina de pescado para mejorar las propiedades tecnológicas y gelificantes (temperaturas de gelificación y fusión, viscoelasticidad en gel). Sin embargo, a pesar de que la literatura científica reporta estos beneficios asociados con el uso de la UF, no se han reportado cambios en las propiedades reológicas por efecto de la adaptación del sistema de UF al proceso productivo de gelatina (Serna-Cock et al., 2010).

Cherkasov y Polotsky (1996), Saxena et al. (2009) y van Reis et al. (2000) indican que la filtración de flujo tangencial convencional se ha limitado tradicionalmente a la separación de solutos que difieren en aproximadamente diez veces su tamaño o más. Según van Reis et al. (2000), esta limitación se debe a las distribuciones de tamaño de poro amplio, la polarización y el colmatado de la membrana y las interacciones proteína-proteína. En la Figura 31 de la sección 5.3.2 se observa que las proteínas extraídas en el licor de pescado a nivel de planta piloto tienen pesos moleculares entre 266 kDa y 92 kDa, donde las moléculas más grandes representan 2,9 veces el tamaño de las moléculas más pequeñas. Por esta razón, se decidió realizar una hidrólisis enzimática leve al licor de pescado, con el objetivo de ampliar la distribución de tamaño de las proteínas de la gelatina, manteniendo su capacidad de gelificar.

5.4.1 Tratamiento enzimático del licor de pescado

Para definir el tratamiento enzimático del licor de pescado se realizaron pruebas preliminares a nivel de planta piloto, utilizando la mitad de la concentración de enzima

sugerida por el proveedor para la hidrólisis de subproductos de pescado. Sin embargo, al momento de realizar las filtraciones se detectó que la mayoría de las fracciones obtenidas perdieron su capacidad de gelificar a temperaturas de refrigeración. Por esta razón se decidió definir el tratamiento enzimático respecto a dos factores: el tiempo y la concentración de enzima, a escala de laboratorio, utilizando la metodología de superficie de respuesta empleando un DCCR. Las variables respuesta fueron la fuerza del gel y las temperaturas de gelificación y fusión de la gelatina obtenida de cada tratamiento. También se evaluó la distribución de tamaño de las proteínas extraídas.

Al aplicar el DCCR se obtiene un polinomio de segundo grado, como se observa a continuación:

$$Y = c_0 + c_1X_1 + c_2X_2 + c_3X_1^2 + c_4X_2^2 + c_4X_1X_2 \quad (17)$$

El modelo se ajusta a los resultados obtenidos en las variables respuesta (ver Cuadro XXVIII), donde Y representa el valor de la variable dependiente (respuesta), c_n representa los coeficientes de regresión del modelo, y X_1 y X_2 el valor de las variables independientes (concentración de la enzima y tiempo del tratamiento enzimático).

El coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2 -adj), la probabilidad del modelo (p), la probabilidad de falta de ajuste (p_{fa}) y el comportamiento en la gráfica de la distribución de residuos de los modelos generados para las diferentes variables respuesta se observan en el Cuadro XXIX.

Cuadro XXIX. Efecto de la concentración de enzima y el tiempo del tratamiento sobre diferentes características evaluadas a un gel elaborado con las proteínas obtenidas.

Variables independientes (X)		Variables dependientes (Y)		
Concentración de enzima ($\mu\text{L}/\text{kg}$)	Tiempo (min)	Fuerza F_g (g)	Temperatura gelificación T_g ($^{\circ}\text{C}$)	Temperatura fusión T_f ($^{\circ}\text{C}$)
11	13	265,47	11,88	19,28
38	30	349,43	12,35	19,73
64	13	31,89	4,86	12,56
38	10	264,58	11,31	18,92
38	20	291,89	12,00	19,42
11	27	204,54	11,22	18,85

Cuadro XXVII (continuación). Efecto de la concentración de enzima y el tiempo del tratamiento sobre diferentes características evaluadas a un gel elaborado con las proteínas obtenidas.

Variables independientes (X)		Variables dependientes (Y)		
Concentración de enzima ($\mu\text{L}/\text{kg}$)	Tiempo (min)	Fuerza F_g (g)	Temperatura gelificación T_g ($^{\circ}\text{C}$)	Temperatura fusión T_f ($^{\circ}\text{C}$)
64	27	213,67	11,24	18,84
38	20	164,79	10,52	18,15
0	20	479,05	14,78	22,13
75	20	78,55	8,14	15,63
38	20	243,62	11,61	19,32

Cuadro XXX. Resultados de los análisis de evaluación de los modelos obtenidos en el tratamiento enzimático del licor de pescado para las diferentes variables respuesta.

Variables respuesta	P	p_{fa}	R^2	$R^2\text{-adj}$	Comportamiento gráfica de residuos
Fuerza del gel F_g (g)	0,2254	0,2403	0,67	0,34	Aleatorio
Temperatura gelificación T_g ($^{\circ}\text{C}$)	0,0575	0,1518	0,82	0,65	Aleatorio
Temperatura fusión T_f ($^{\circ}\text{C}$)	0,0589	0,1353	0,82	0,44	Aleatorio

Los modelos para las variables respuesta fuerza de gel y temperaturas de gelificación y fusión del gel tienen un probabilidad del modelo no significativa ($p > 0,05$). La fuerza de gel tiene valores de R^2 y $R^2\text{-adj}$ bajos ($< 0,7$) y las temperaturas de gelificación y fusión, aunque tienen valores de R^2 aceptables ($> 0,8$), presentan valores de $R^2\text{-adj}$ bajos ($< 0,7$) por lo que se considera que los modelos generados no logran explicar la variación de los resultados obtenidos experimentalmente.

El tratamiento enzimático se realizó utilizando la enzima Novo-ProD[®], producida por la empresa Novozymes[®], cuya actividad de hidrólisis se debe a una serina endoproteasa (Subtilisina), que hidroliza enlaces peptídicos internos. En la Figura 32 se muestran los tamaños de las proteínas obtenidas y su distribución según el tratamiento realizado. Se observa que en los tratamientos donde se utilizó la enzima se hidrolizan totalmente las cadenas γ y β y parcialmente las cadenas α , obteniéndose un tamaño promedio menor de las proteínas pero una distribución de tamaños mayor.

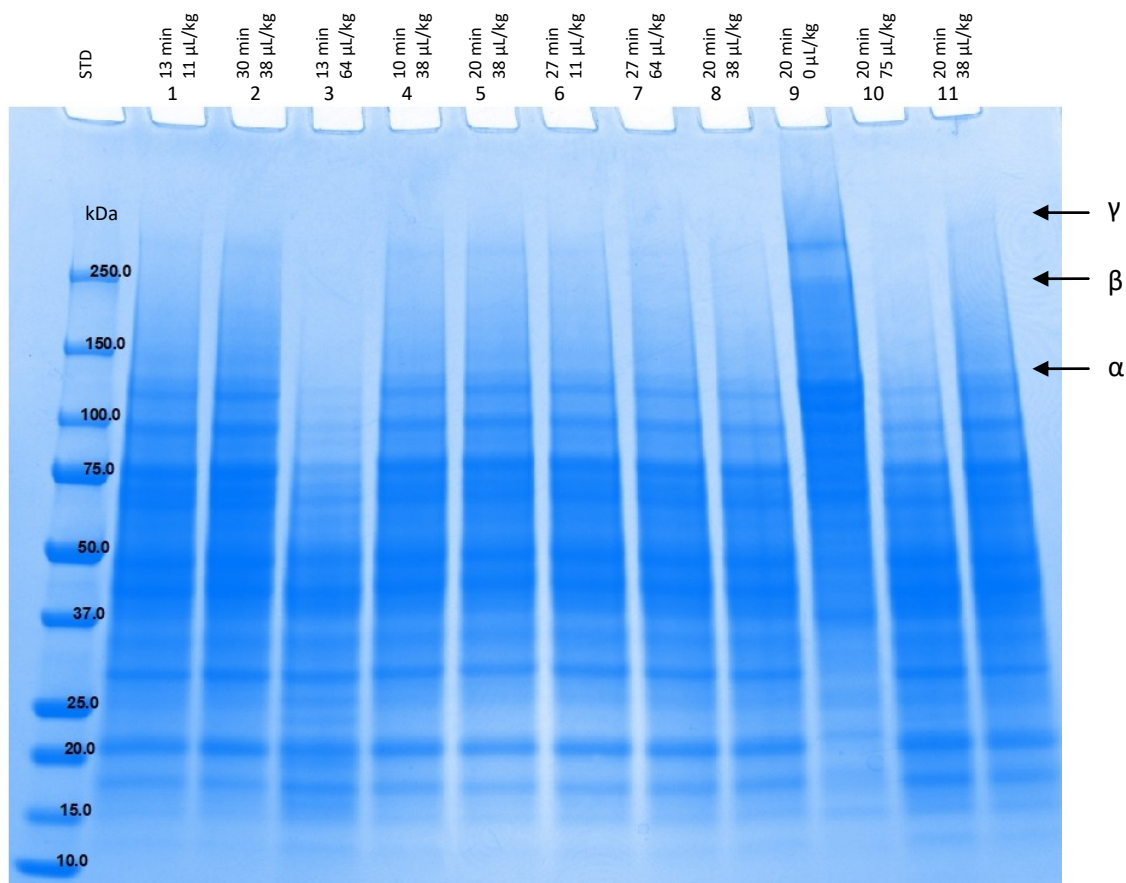


Figura 32. Electroforesis SDS-PAGE de las proteínas obtenidas del licor de piel de atún para la evaluación del tratamiento enzimático del licor. STD: Estándar.

Se destaca que en el tratamiento 9 se presenta el mayor tamaño de proteínas al aplicarse un tratamiento sin enzima, obteniendo los valores puntuales más altos en las tres variables respuesta. En el caso de los tratamientos 3 y 10 se observan los tamaños de partículas más pequeños. En estos tratamientos se utilizaron las mayores concentraciones de enzima, provocando una mayor hidrólisis y obteniendo valores menores en las tres variables respuesta. Según Haug et al. (2004), Karim y Bhat (2009) y Kim et al. (2013), existe una correlación entre las propiedades de gelificación y el tamaño de las proteínas de la gelatina, obteniéndose valores más altos de estas propiedades al tener mayores tamaños de las proteínas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos. En el tratamiento 7 se utilizó una concentración de enzima alta; sin embargo, no se observó una mayor hidrólisis de proteínas respecto a los

tratamientos donde se utilizaron menores concentraciones de enzima, lo cual se puede deber a la variabilidad del proceso.

Tomando en cuenta los resultados de la fuerza de gel y de las temperaturas de gelificación y fusión, se decidió utilizar el tratamiento enzimático definido en el punto central del diseño experimental (20 min y 38 μL de enzima/ kg de licor), donde se obtiene una relación de tamaños entre las proteínas de mayor tamaño y las de menor tamaño de 8,3 en promedio. La hidrólisis total de las cadenas de gelatina γ y β no permitieron obtener relaciones de tamaño mayores a 10, mínimo necesario para separar proteínas utilizando filtración tangencial convencional, según Cherkasov y Polotsky (1996), Saxena et al. (2009) y van Reis et al. (2000). Sin embargo, se aumentó la relación de tamaños respecto al valor obtenido en el licor de pescado producido a nivel de planta piloto (2,9), manteniendo su capacidad de gelificar.

5.4.2 Fraccionamiento de las proteínas del licor de pescado

Según Abejón et al. (2016), la recuperación de compuestos químicos de subproductos de procesamiento de pescado tiene una gran potencialidad, pero se deben proponer procesos de separación adecuados. Además, los autores indican que la aplicación de UF y NF en cascada (en serie) pueden utilizarse para separar las fracciones proteicas de una mezcla muy compleja obtenida después de la hidrólisis enzimática de subproductos de atún. Para el fraccionamiento de las proteínas del licor de pescado se utilizaron 4 membranas en serie (0,8 μm , 100 nm, 50 nm y 20 nm). A continuación se analizará el efecto de cada membrana sobre las propiedades de gelificación de las proteínas y su productividad y posteriormente se evaluará el efecto del proceso en serie completo.

5.4.2.1 Fraccionamiento con la membrana de 0,8 μm

La membrana de 0,8 μm de tamaño promedio de poro está dentro del rango de las tecnologías de membrana de microfiltración, de 0,1 a 10 μm (Tewari, 2015). Se utilizó

como una prefiltración con el objetivo de remover partículas de grasa o sólidos insolubles en suspensión que no se lograron separar en la etapa de centrifugación. La MF se utiliza para clarificar lodos o remover partículas suspendidas (Afonso y Bórquez, 2002; Cheryan, 2006; Kuca y Szaniawska, 2009). Las filtraciones se realizaron a una temperatura de 60 °C y la presión transmembranaria se mantuvo entre 0,7 y 1,0 bar, temperaturas y presiones normales para los procesos de MF, según Saravacos y Maroulis (2003). En la Figura 33 se observan los flujos de permeado obtenidos respecto al FRV en las 3 repeticiones realizadas.

Se observa cómo al inicio del proceso los flujos de permeados son altos (mayores a 1000 kg/hm², fluctúan hasta alcanzar un FRV de aproximadamente 8,25, donde se obtiene un flujo de permeado de 1274 ± 64 kg/hm² y un rendimiento de permeado del 88%. Según Cheryan (1998), para la MF y UF se presenta un efecto directamente proporcional y lineal entre la presión y el flujo de permeado en un rango específico de presión que se conoce como la región de presión controlada.

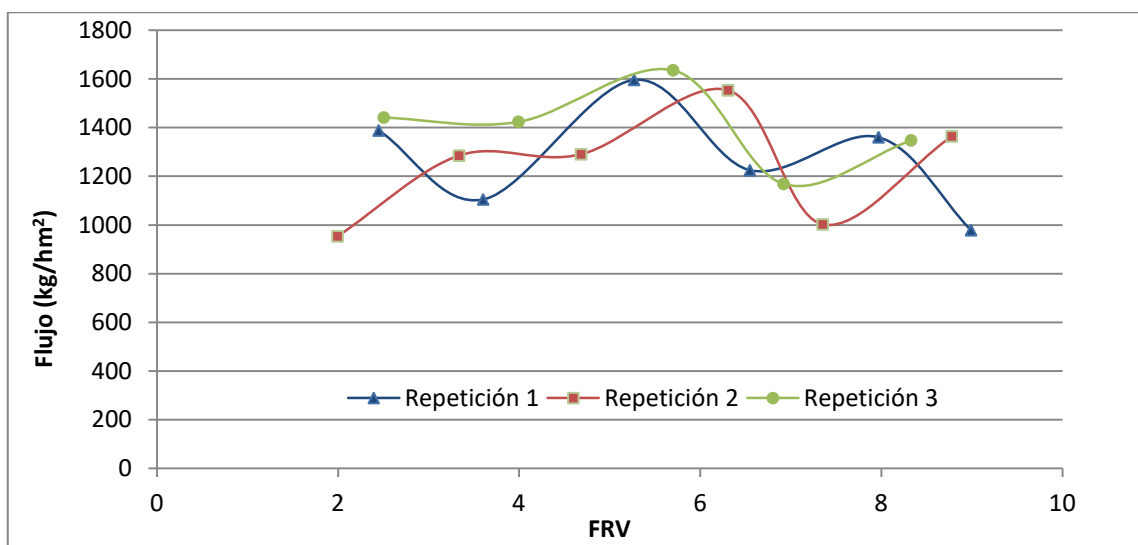


Figura 33. Flujo de permeado respecto al FRV en la microfiltración de licor de pescado en una membrana de 0,8 µm (Temperatura: 60 °C; P_{tm} : 0,7-1,0 bar).

En el cuadro XXX se observa el efecto de la MF, utilizando la membrana de 0,8 µm, sobre las propiedades gelificantes de las proteínas del licor de pescado, donde no se

presentan diferencias significativas entre los tratamientos. En la Figura 34 se observa la distribución de tamaño de las gelatinas de los diferentes tratamientos.

Cuadro XXXI. Propiedades gelificantes de las gelatinas del licor de alimentación, el retenido y el permeado en el proceso de MF utilizando una membrana de 0,8 μm de diámetro de poro.

Tratamiento	Fuerza del gel (g) ¹	Temperatura de gelificación (°C) ¹	Temperatura de fusión (°C) ¹
<i>Alimentación</i>	228 \pm 130	11 \pm 1	19 \pm 1
<i>Retenido</i>	242 \pm 93	11 \pm 1	19 \pm 1
<i>Permeado</i>	237 \pm 100	11 \pm 1	18,6 \pm 0,9

¹Valores reportados como promedio \pm intervalo de confianza (n=3, nivel de confianza del 95%).

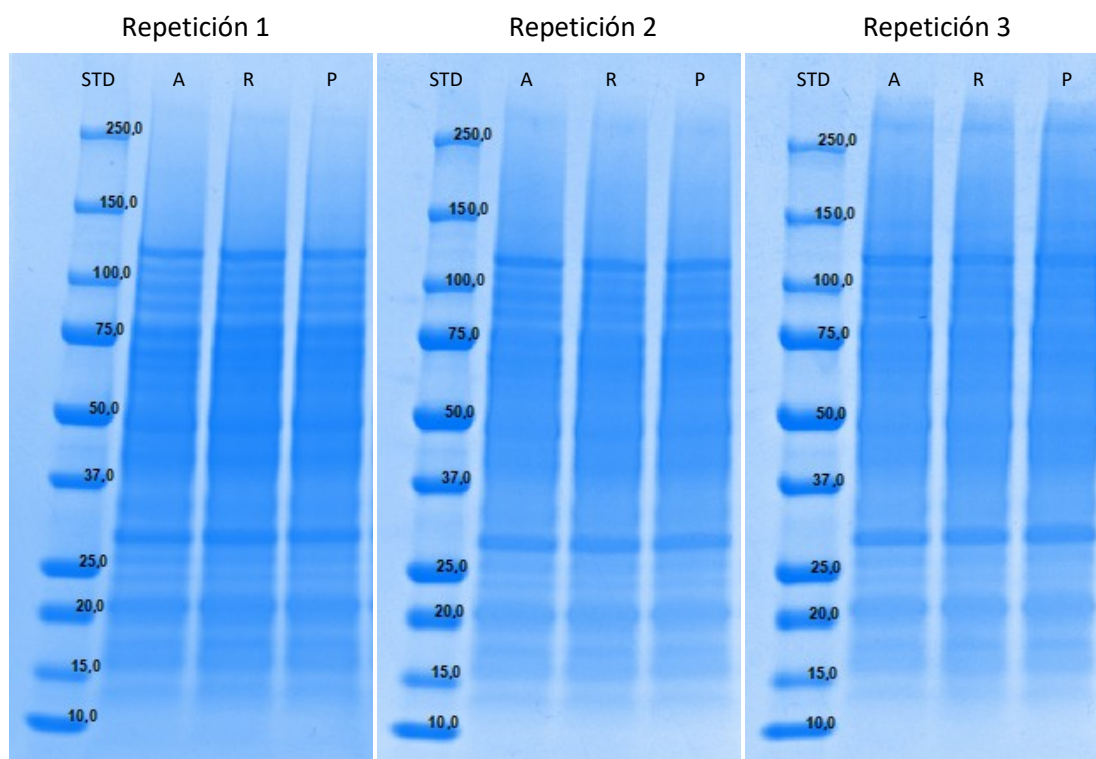


Figura 34. Electroforesis SDS-PAGE de las gelatinas del licor de alimentación (A), del retenido (R) y del permeado (P) en el proceso de MF utilizando una membrana de 0,8 μm de diámetro de poro. STD: Estándar.

El tamaño del poro de la membrana utilizada permite que pasen todas las fracciones proteicas; por lo tanto, no se presentan cambios en la distribución de tamaños de las proteínas. Como se mencionó anteriormente, el tamaño de las proteínas de la gelatina

influye en sus propiedades de gelificación. Según se observa en la Figura 34, los tratamientos tienen una distribución de tamaños similar, lo que explica que no se encontraran diferencias en las propiedades gelificantes de las tres corrientes.

5.4.2.2 Fraccionamiento con la membrana de 100 nm

La membrana de 100 nm de tamaño promedio de poro está en el límite entre la MF y la UF. En este caso se utilizó con el fin de fraccionar las proteínas de mayor tamaño, función propia de la UF. Según Cheryan (2006) y Kuca y Szaniawska (2009), la UF se utiliza para separar moléculas de alto peso molecular de otras de menor tamaño, y para concentrar proteínas. Tewari (2015) indica que la UF puede retener moléculas con tamaños moleculares dentro del rango de los 500 kDa a los 300 Da, mientras Saravacos y Maroulis (2003) indican un rango más estrecho (2 a 300 kDa). Las filtraciones se realizaron a una temperatura de 60 °C y la presión transmembranaria se mantuvo entre 1,2 y 1,4 bar. En la Figura 35 se observan los flujos de permeado obtenidos respecto al FRV en las 3 repeticiones realizadas.

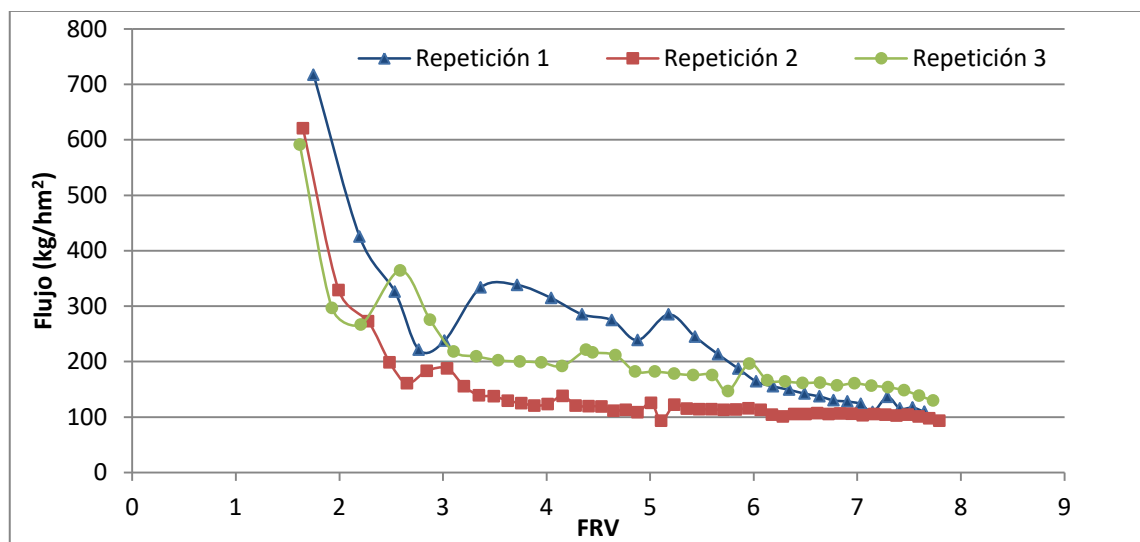


Figura 35. Flujo de permeado respecto al FRV en la ultrafiltración de licor de pescado en una membrana de 100 nm (Temperatura: 60 °C; P_{tm} : 1,2-1,4 bar).

Se observa que al inicio del proceso los flujos de permeados son altos, reduciéndose rápidamente y pasando por un periodo de fluctuaciones hasta alcanzar un FRV de 3;

posteriormente se estabilizan, manteniendo una leve disminución hasta alcanzar un FRV de aproximadamente 7,5, donde se obtiene un flujo de permeado de 122 ± 24 kg/hm² y un rendimiento de permeado del 87%. Este comportamiento coincide con lo expuesto por Girard et al. (2000), Costa et al. (2018) y Crowley et al. (2015), que indican que se presentan 3 fases: la primera donde se presenta una disminución del flujo, la segunda donde se producen fluctuaciones del flujo y la tercera donde se estabiliza el flujo, reduciéndose de manera logarítmica. La reducción del flujo se da por los fenómenos de polarización y colmataje de la membrana que aumentan la resistencia al flujo (Costa et al., 2018; Diná Afonso et al., 2004; Saravacos y Maroulis, 2003).

En el Cuadro XXXI se observa el efecto de la UF, utilizando la membrana de 100 nm, sobre las propiedades gelificantes de las proteínas del licor de pescado. Se destaca que tanto el licor retenido y como el permeado no presentan diferencias significativas respecto al licor de alimentación, pero sí son significativamente diferentes entre ellos. En la Figura 36 se observa la distribución de tamaño de los licores obtenidos.

Cuadro XXXII. Propiedades gelificantes de las gelatinas del licor de alimentación, el retenido y el permeado en el proceso de UF utilizando una membrana de 100 nm de diámetro de poro.

Tratamiento	Fuerza del gel (g)^{1,2}	Temperatura de gelificación (°C)^{1,2}	Temperatura de fusión (°C)^{1,2}
<i>Alimentación</i>	237 ± 100ab	11 ± 1ab	18,6 ± 0,9ab
<i>Retenido</i>	440 ± 130a	12,7 ± 0,7a	19,9 ± 0,7a
<i>Permeado</i>	163 ± 72b	10 ± 1b	17 ± 1b

¹ Valores reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3, nivel de confianza del 95%).

² Promedios con una letra diferente en la misma columna son significativamente diferentes (p < 0,05).

La diferencia que se presenta entre las propiedades de gelificación se debe a la retención parcial de las proteínas de mayor peso molecular que se evidencian en la Figura 36, donde se presenta una mayor densidad de proteínas con pesos moleculares mayores a los 50 kDa en el licor retenido respecto al permeado en las tres repeticiones. El tamaño de estas moléculas es menor al de los poros de la membrana;

sin embargo, los fenómenos de polarización y colmataje producen una capa en la superficie de la membrana que cambia su selectividad inicial, permitiendo que se retengan proteínas de menor tamaño que el diámetro de poro promedio. Según Tewari (2015) y van Reis et al. (2000), la polarización y el colmatado afectan el flujo de permeado y la selectividad de la membrana.

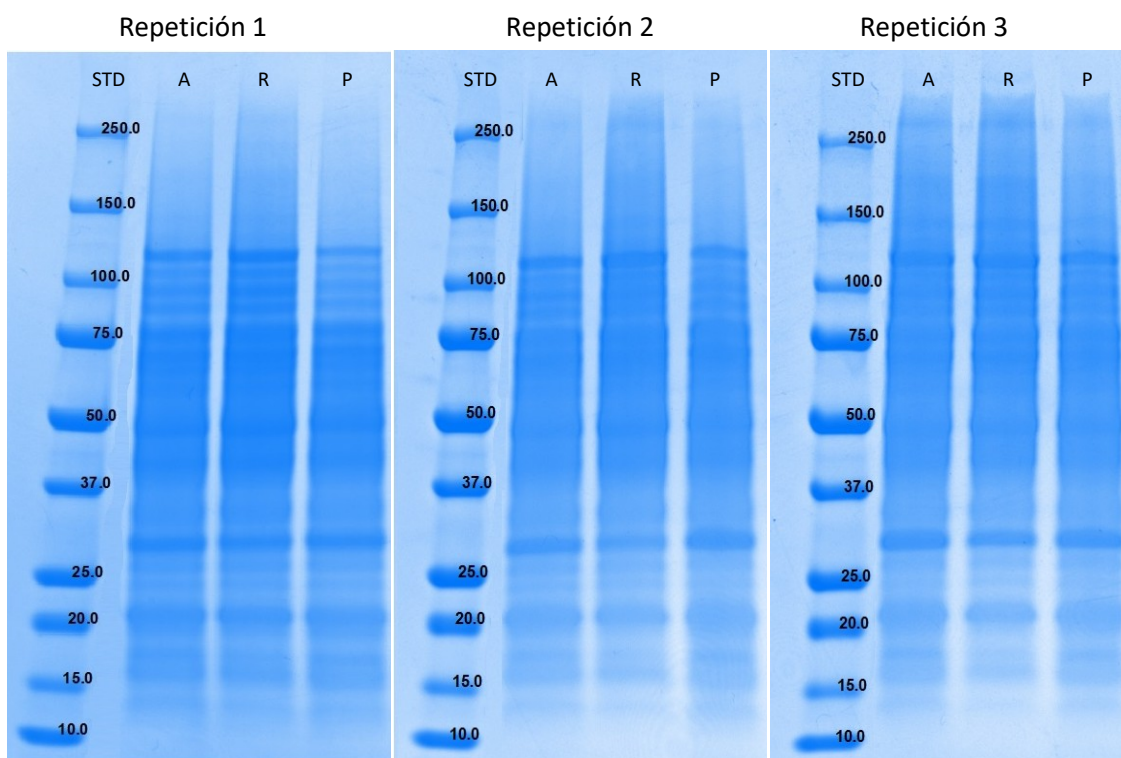


Figura 36. Electroforesis SDS-PAGE de las gelatinas del licor de alimentación (A), del retenido (R) y del permeado (P) en el proceso de UF utilizando una membrana de 100 nm de diámetro de poro. STD: Estándar.

5.4.2.3 Fraccionamiento con la membrana de 50 nm.

La membrana de 50 nm de tamaño promedio de poro corresponde a la UF. Se utilizó con el objetivo de fraccionar las proteínas que permearon a través de la membrana de 100 nm. Tewari (2015) indica que la UF presenta tamaños de poro entre los 1000 Å (100 nm) y los 20 Å (2 nm). Las filtraciones se realizaron a una temperatura de 60 °C y la presión transmembranaria se mantuvo entre 1,2 y 1,4 bar. En la Figura 37 se

observan los flujos de permeado obtenidos respecto al FRV en las 3 repeticiones realizadas.

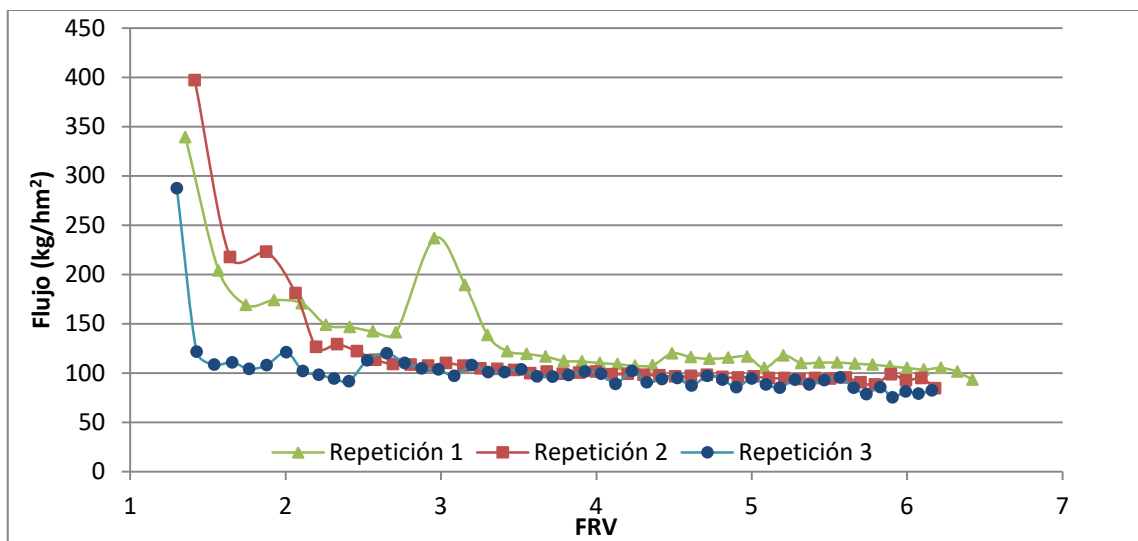


Figura 37. Flujo de permeado respecto al FRV en la ultrafiltración de licor de pescado en una membrana de 50 nm (Temperatura: 60 °C; P_{tm} : 1,2-1,4 bar).

Se observa un comportamiento similar al obtenido con la membrana de 100 nm. Al inicio del proceso los flujos de permeados son altos, reduciéndose rápidamente hasta alcanzar un FRV aproximado de 1,5 y pasando por un periodo de fluctuaciones hasta alcanzar un FRV de 2,5. Posteriormente se estabilizan, manteniendo una leve disminución hasta alcanzar un FRV de aproximadamente 6, donde se obtiene un flujo de permeado de 93 ± 14 kg/hm² y un rendimiento de permeado del 83%. Este comportamiento coincide con lo expuesto por Girard et al. (2000) y Crowley et al. (2015).

En el Cuadro XXXII se observa el efecto de la UF, utilizando la membrana de 50 nm, sobre las propiedades gelificantes de las proteínas del licor de pescado. En la fuerza de gel y la temperatura de gelificación se presenta el mismo comportamiento que se observó en con la membrana de 100 nm, el retenido es significativamente mayor que el permeado, pero ninguno es significativamente diferente al licor de alimentación. En el caso de la temperatura de fusión no se presentaron diferencias entre los 3

tratamientos ($p = 0,077$). En la Figura 38 se observa la distribución de tamaños de los tres licores.

Cuadro XXXIII. Propiedades gelificantes de las gelatinas del licor de alimentación, el retenido y el permeado en el proceso de UF utilizando una membrana de 50 nm de diámetro de poro.

Tratamiento	Fuerza del gel (g) ^{1,2}	Temperatura de gelificación (°C) ^{1,2}	Temperatura de fusión (°C) ^{1,2}
<i>Alimentación</i>	163 ± 72ab	10 ± 1ab	17 ± 1
<i>Retenido</i>	326 ± 89a	12 ± 1a	19 ± 1
<i>Permeado</i>	119 ± 62b	9 ± 1b	17 ± 1

¹ Valores reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3, nivel de confianza del 95%).

² Promedios con una letra diferente en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

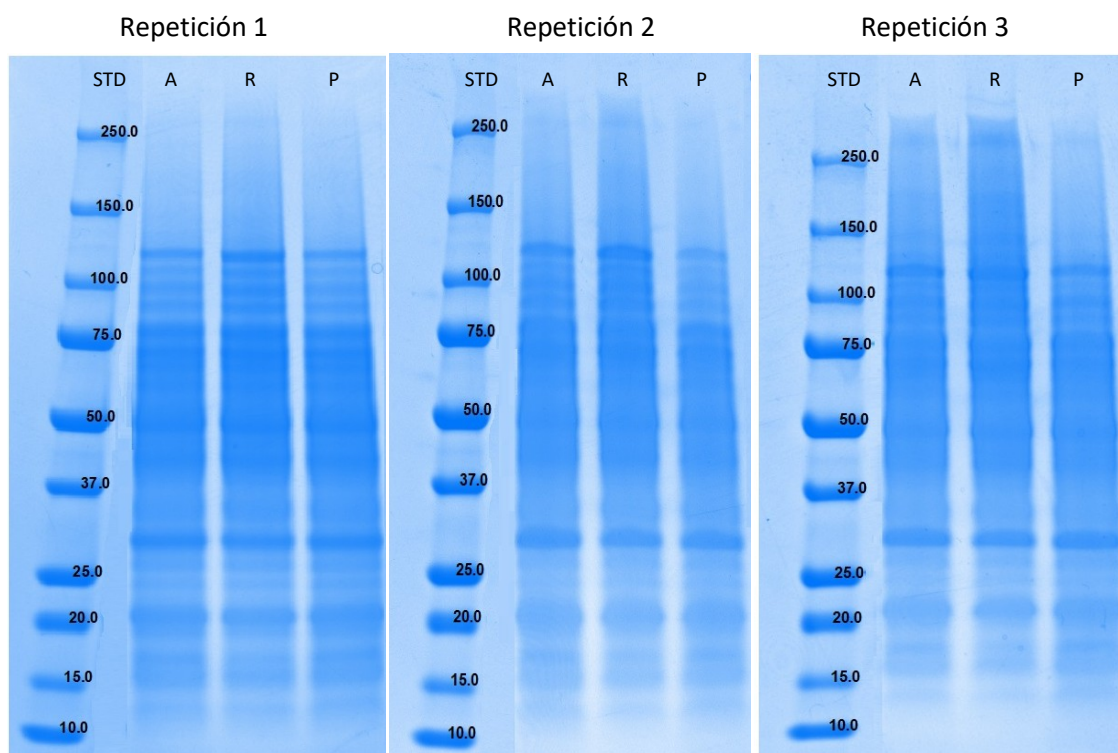


Figura 38. Electroforesis SDS-PAGE de las gelatinas del licor de alimentación (A), del retenido (R) y del permeado (P) en el proceso de UF, utilizando una membrana de 50 nm de diámetro de poro. STD: Estándar.

Las diferencias que se presentan entre la fuerza del gel y la temperatura de gelificación del licor retenido y del permeado se deben a la retención parcial de las proteínas de mayor peso molecular que se evidencia en la Figura 38, donde se presenta una mayor densidad de proteínas con pesos moleculares mayores a los 50 kDa en el licor respecto al permeado en la tres repeticiones, más evidente en la proteínas con pesos moleculares mayores a 75 kDa. Haug et al. (2004), Karim y Bhat (2009) y Kim et al. (2013) indican que existe una correlación entre las propiedades de gelificación y el tamaño de las proteínas de la gelatina, obteniéndose valores más altos de estas propiedades al tener mayores tamaños las gelatinas, lo cual concuerda con los resultados obtenidos.

5.4.2.4 Fraccionamiento con la membrana de 20 nm

La membrana de 20 nm de tamaño promedio de poro se utilizó con el objetivo de fraccionar las proteínas con tamaños mayores a los 100 kDa. Las filtraciones se realizaron a una temperatura de 60 °C y la presión transmembranaria se mantuvo entre 1,6 y 1,8 bar, presión mayor a la utilizada con las membranas de 0,8 μm , 100 nm y 50 nm. Esto se debe al aumento en la resistencia mecánica de la membrana, por un menor diámetro del poro, que genera una mayor presión transmembranaria al utilizar el mismo sistema de bombeo. A menor diámetro de poro es necesaria una presión transmembranaria mayor para producir el flujo de permeado.

En la Figura 39 se observan los flujos de permeado obtenidos respecto al FRV en las 3 repeticiones realizadas. Se produce una reducción rápida hasta alcanzar un FRV aproximado de 1,5, pasando por un periodo de fluctuaciones hasta alcanzar un FRV de 1,75; posteriormente se estabilizan, manteniendo una disminución hasta alcanzar un FRV de aproximadamente 3,25, donde se obtiene un flujo de permeado de 29 ± 12 kg/hm^2 y un rendimiento de permeado del 70%. El bajo flujo de permeado respecto a los presentados con las membranas de 100 nm y 50 nm se debe al aumento en la

resistencia mecánica por trabajar con poros de menor diámetro y a la polarización y el colmataje de la membrana.

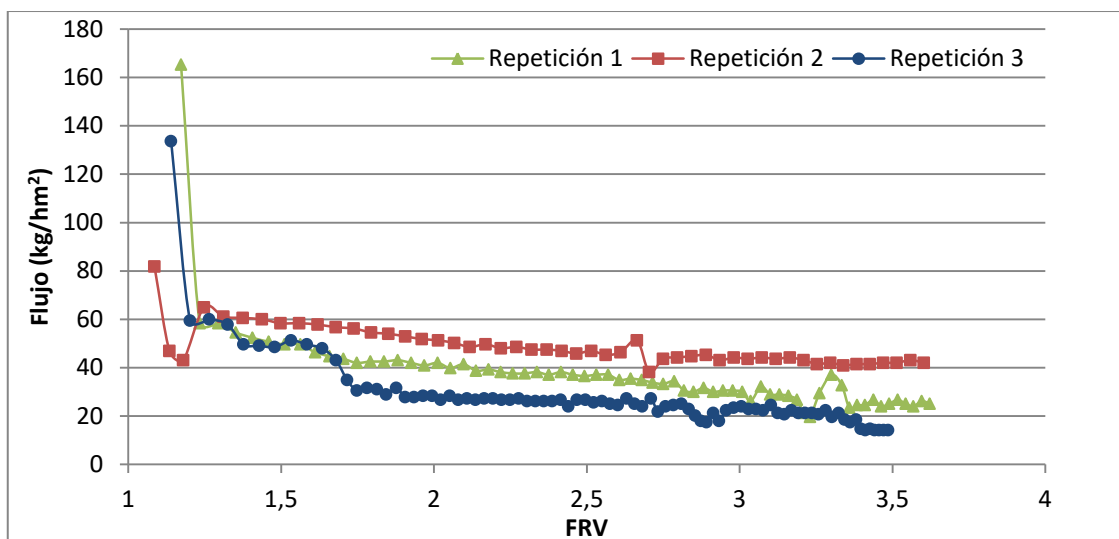


Figura 39. Flujo de permeado respecto al FRV en la ultrafiltración de licor de pescado en una membrana de 20 nm (Temperatura: 60 °C; P_{tm} : 1,6-1,8 bar).

En el Cuadro XXXII se observa el efecto de la UF, utilizando la membrana de 20 nm, sobre las propiedades gelificantes de las proteínas del licor de pescado. Se observa que para la fuerza de gel y la temperatura de gelificación los tres tratamientos son significativamente diferentes ($p < 0,05$). En el caso de la temperatura de fusión el permeado es significativamente diferente ($p < 0,05$), pero entre el retenido y el licor de alimentación no hay diferencia significativa ($p = 0,07$).

Cuadro XXXIV. Propiedades gelificantes de las gelatinas del licor de alimentación, el retenido y el permeado en el proceso de UF utilizando una membrana de 20 nm de diámetro de poro.

Tratamiento	Fuerza del gel (g) ^{1,2}	Temperatura de gelificación (°C) ^{1,2}	Temperatura de fusión (°C) ^{1,2}
<i>Alimentación</i>	119 ± 62b	9 ± 1b	17 ± 1a
<i>Retenido</i>	296 ± 38a	11,3 ± 0,4a	18,6 ± 0,6a
<i>Permeado</i>	5,1 ± 0,8c	-1,6 ± 0,7c	5,3 ± 8b

¹ Valores reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3, nivel de confianza del 95%).

² Promedios con una letra diferente en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Las diferencias que se presentan en las propiedades de gelificación se deben a la alta retención de las moléculas con tamaños entre los 50 kDa y los 75 kDa y a la total retención de las proteínas con pesos moleculares mayores a los 75 kDa (ver Figura 40). Esta última fracción está compuesta por las cadenas α que se presentan en el licor de alimentación. Estudios recientes indican que la fuerza de gel de la gelatina se correlaciona positivamente con la proporción de cadenas α y β , y negativamente con las cadenas con pesos moleculares inferiores a los 100 kDa (Eysturskarð et al., 2009b). Las temperaturas de gelificación y fusión siguen el mismo comportamiento, donde el permeado obtenido a partir de la membrana de 20 nm, al no tener proteínas de pesos moleculares mayores a 75 kDa, presenta temperaturas de gelificación y fusión muy bajas, y bajos valores de fuerza del gel.

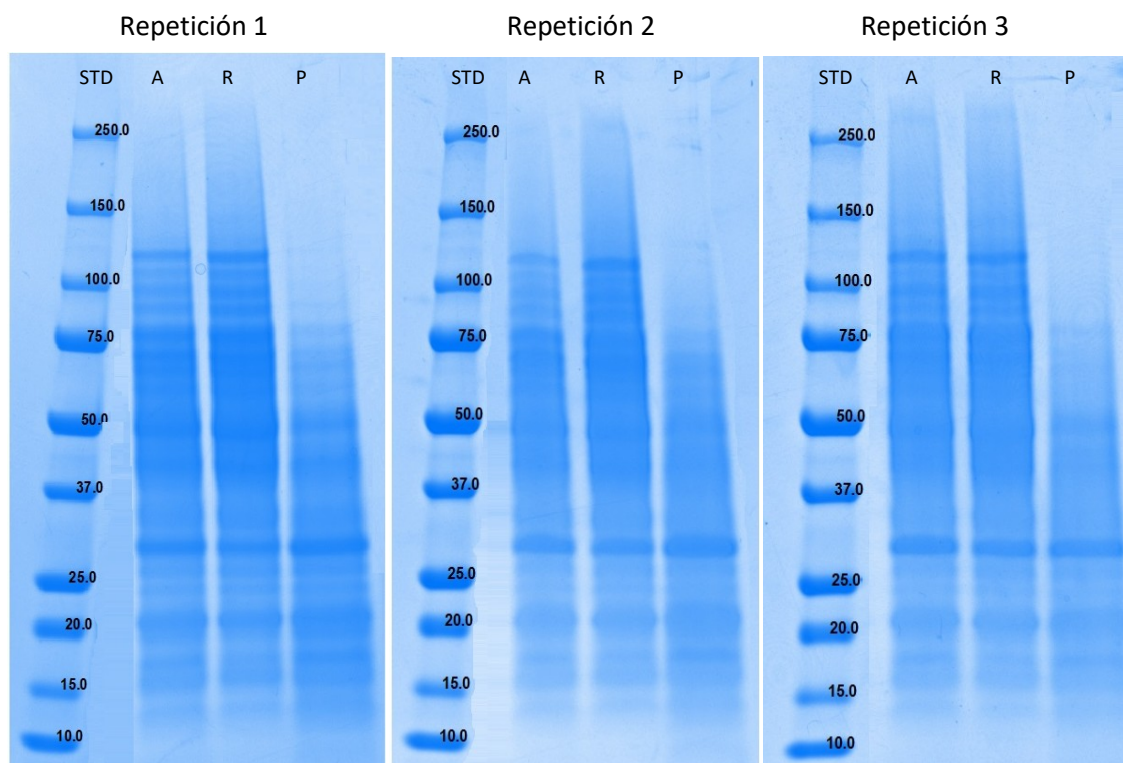


Figura 40. Electroforesis SDS-PAGE de las gelatinas del licor de alimentación (A), el retenido (R) y el permeado (P) en el proceso de UF utilizando una membrana de 20 nm de diámetro de poro. STD: Estándar.

5.4.2.5 Fraccionamiento del licor de pescado utilizando 4 membranas en serie.

El sistema de fraccionamiento general (4 membranas en serie) separa el licor de alimentación en cinco fracciones: los retenidos de las 4 membranas y el permeado de la membrana de 20 nm. En el Cuadro XXXIV se observa que las propiedades de gelificación de los retenidos y del licor de alimentación no presentan diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$). El permeado de la membrana de 20 nm presenta fuerzas de gel y temperaturas de gelificación y fusión significativamente menores a los demás tratamientos.

Cuadro XXXV. Propiedades gelificantes de las gelatinas del licor de alimentación y las 5 fracciones obtenidas en el proceso de filtración en serie.

Tratamiento	Fuerza del gel (g) ^{1,2}	Temperatura de gelificación (°C) ^{1,2}	Temperatura de fusión (°C) ^{1,2}
<i>Alimentación</i>	228 ± 130a	11 ± 1a	19 ± 1a
<i>Retenido 0,8 μm</i>	242 ± 93a	11 ± 1a	19 ± 1a
<i>Retenido 100 nm</i>	440 ± 130a	12,7 ± 0,7a	19,9 ± 0,7a
<i>Retenido 50 nm</i>	326 ± 89a	12 ± 1a	19 ± 1a
<i>Retenido 20 nm</i>	296 ± 38a	11,3 ± 0,4a	18,6 ± 0,6a
<i>Permeado 20 nm</i>	5,1 ± 0,8b	-1,6 ± 0,7b	5,3 ± 8b

¹ Valores reportados como promedio ± intervalo de confianza (n=3, nivel de confianza del 95%).

² Promedios con una letra diferente en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En el caso de las temperaturas de gelificación y fusión, las proteínas de los retenidos y del licor de alimentación presentan valores en los rangos de 10,0 a 13,4 °C y 18,0 a 20,6 °C, respectivamente, valores normales para las gelatinas de pescado. Según Karayannakidis y Zotos (2016), las gelatinas de pescado presentan temperaturas de gelificación que oscilan entre los 8 °C y 25 °C y de fusión entre los 11 °C y 28 °C. Las temperaturas de los retenidos del proceso son menores a las que se obtuvieron en la optimización del proceso de extracción y en el escalamiento. También a las obtenidas en otros estudios que trabajaron con piel de atún Ninan et al. (2013) (18,80 °C ± 0,14 °C y 20,33 °C ± 0,14 °C, respectivamente), Yoo et al. (2008) (18,8 °C y 24,0 °C, respectivamente) y Cho et al. (2005) (18,7 °C y 24,3 °C, respectivamente). Los valores

menores se deben al efecto del tratamiento enzimático realizado al licor de piel de atún previo al fraccionamiento.

Respecto a la fuerza del gel se presenta un comportamiento similar al de las temperaturas, donde los retenidos de las 4 membranas presentan valores de fuerza de gel entre 150 g y 516 g, menores a los que se obtuvieron en la gelatina obtenida en la optimización del proceso de extracción y en el escalamiento, producto de la reducción del tamaño de las moléculas por el efecto del tratamiento enzimático.

Al observar la distribución de tamaños de estas fracciones (ver Figura 41) se destaca que las fracciones de alimentación y los retenidos presentan distribuciones de tamaño de proteínas muy similares, destacando la presencia de fracciones con pesos moleculares mayores a los 75 kDa, en especial de fracciones mayores a 100 kDa, tamaño característico de las cadenas de gelatina α , que son importantes para obtener mejores propiedades de gelificación. Darine et al. (2010) indican que las propiedades tecnofuncionales de las proteínas dependen de su estructura, en especial de su peso molecular, su hidrofobicidad y su conformación secundaria y terciaria.

Este comportamiento indica que las membranas de 100 y 50 nm presentan una retención parcial de las moléculas de tamaños mayores a los 75 kDa, ya que se presentan tanto en el retenido de dichas membranas como en el retenido de las membranas de las filtraciones posteriores. En el caso de la membrana de 20 nm, presenta una retención total de las proteínas con pesos moleculares mayores a los 75 kDa, lo cual indica que los poros de dicha membrana tienen un diámetro inferior al tamaño de estas fracciones.

La utilidad del sistema de membrana depende del grado de separación deseado y la velocidad de separación (Pabby et al., 2015). Respecto a la selectividad se determinó que la membrana que permite separar las proteínas de mayor tamaño es la de 20 nm de tamaño de poro, por lo que podría ser la única que se utilice para fraccionar el licor. Sin embargo, se debe evaluar si la aplicación de filtraciones previas permite obtener

flujos más altos en la UF a 20 nm, al retener parcialmente las moléculas de mayor tamaño que podrían provocar un colmataje mayor de la membrana y, por lo tanto, menores flujos. Kuca y Szaniawska (2009) indican que la aplicación de una técnica adecuada de membrana, depende tanto de la apropiada separación de sustancias específicas, como de la posibilidad de minimizar la disminución del flujo de permeado causada por el colmataje.

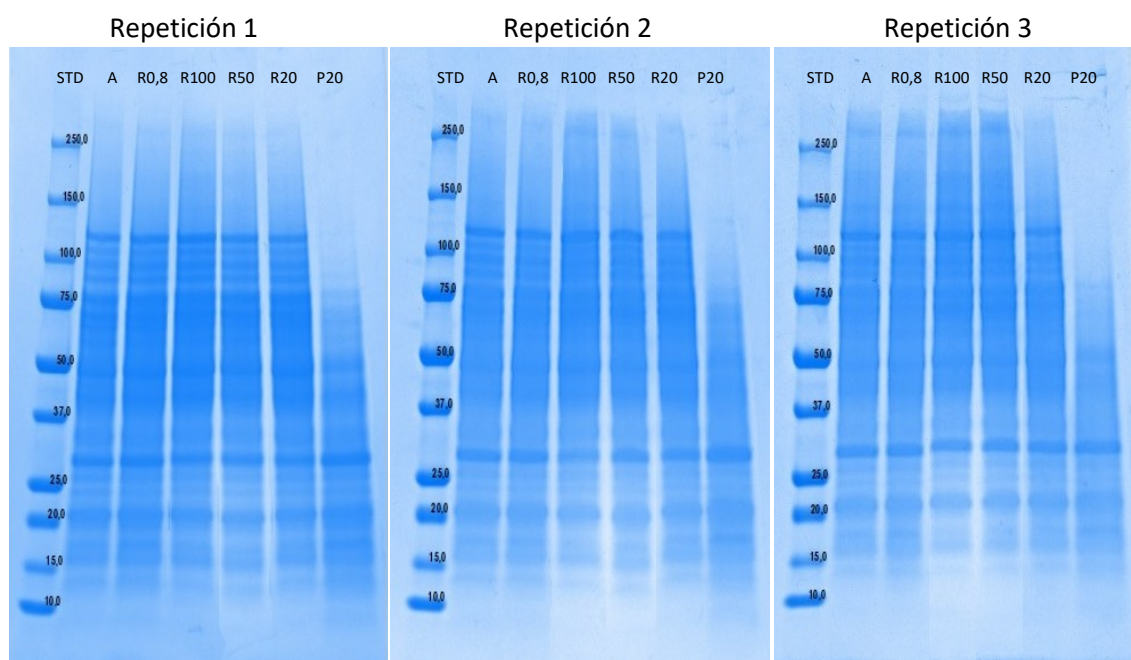


Figura 41. Electroforesis SDS-PAGE de las gelatinas del licor de alimentación (A), los retenidos (R0,8; R100; R50; R20) y el permeado final (P20) del proceso de fraccionamiento utilizando 4 membranas en serie. STD: Estándar.

Respecto a los flujos de permeado obtenidos en las membranas de UF (100, 50 y 20 nm), estos se encuentran dentro del rango indicado por Saravacos y Maroulis (2003) (5 – 500 L/hm²), pero se debe trabajar en la optimización de los procesos con el fin de obtener una mayor productividad en cada filtración. Por ejemplo, se podría aumentar la presión transmembranaria, ya que se trabajó con presiones menores a los 2 bar y se ha reportado que en la UF se pueden alcanzar presiones transmembranarias superiores a los 9 bar (Saravacos y Maroulis, 2003; Tewari, 2015); otra opción podría ser aumentar la velocidad tangencial.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- Se pudo modelar y verificar el efecto de la concentración de ácido acético en el pretratamiento ácido sobre las variables respuesta hidratación de la piel, masa de licor de pescado y pH del gel, ya que los modelos generados cumplieron con la predicción de estas variables respuesta. La concentración de ácido acético óptima respecto a la variable respuesta de hidratación de la piel es de 0,225 M.
- Se pudo modelar y verificar el efecto del tiempo y la temperatura de extracción sobre las variables respuesta temperaturas de gelificación y fusión y fuerza del gel, ya que los modelos generados cumplieron con la predicción de estas variables respuesta. El tratamiento de extracción óptimo respecto a las variables respuesta de temperatura de fusión y temperatura de gelificación corresponde a una temperatura de 54 °C y un tiempo de 0,38 h.
- Se logró escalar, a nivel de planta piloto, el proceso de producción de licor de pescado optimizado en el laboratorio para procesar una cantidad de piel de atún 80 veces mayor. En términos de rendimiento de las etapas de proceso y de composición de los subproductos se presentaron pocas diferencias. Las propiedades de gelificación de las proteínas extraídas solo presentaron desviaciones menores respecto a la temperatura de gelificación. Los factores que pudieron influir en las diferencias detectadas, durante el escalamiento, fueron las dimensiones y mecanismos de funcionamiento de la marmita (incluyendo el sistema de calefacción y agitación) y la centrífuga, y el aumento en los tiempos de separación de la piel y diferentes fracciones líquidas.
- Se logró ampliar el diferencial de tamaños, de 2,9 a 8,3 y el rango de tamaño de las proteínas del licor de pescado aplicando un tratamiento enzimático de 20 min,

a 60 °C con una concentración de enzima de 38 μ L de enzima/ kg de licor. El tratamiento hidrolizó las cadenas β y γ , manteniendo una alta proporción de cadenas α , con pesos moleculares mayores a los 100 kDa, que permiten la gelificación del licor a temperaturas de refrigeración.

- Al evaluar el efecto individual de cada membrana se concluye que la membrana de 0,8 μ m no afecta las propiedades de gelificación del licor de alimentación. Las membranas de 100 nm, 50 nm y 20 nm, sí tienen un efecto sobre el licor de alimentación procesado al obtener permeados y retenidos con diferentes propiedades de gelificación, debido a la retención parcial (100 nm y 50 nm) o total (20 nm) de las proteínas con pesos moleculares mayores a los 75 kDa.
- Al evaluar el fraccionamiento en serie se concluye que los retenidos de todas las membranas presentan una distribución de tamaños similar y por ende no presentan diferencias significativas en sus características de gelificación. El permeado de 20 nm presenta los valores de las propiedades de gelificación más bajos, además de una distribución de tamaños donde no se presentan proteínas con pesos moleculares mayores a 75 kDa, lo que indica que las propiedades de gelificación dependen del tamaño de las cadenas de proteínas.

6.2 Recomendaciones

- Evaluar el tipo y contenido de aminoácidos de las gelatinas obtenidas para determinar la proporción de prolina e hidroxiprolina y su relación con las propiedades gelificantes, para compararla con la gelatina obtenida de otros subproductos pesqueros.
- Procesar cantidades suficientes de piel de atún en las condiciones óptimas del pretratamiento ácido y de la etapa de extracción que permitan evaluar la fuerza de gel (grados Bloom) por el método estándar, para poder comparar esta propiedad con otros estudios.

- Evaluar la fuerza de gel y las temperaturas de gelificación y fusión de gelatinas comerciales para compararlas con la gelatina de piel de atún obtenida en este estudio.
- Utilizar una marmita que presente agitación mecánica para las etapas del pretratamiento ácido y de la extracción a nivel de planta piloto. Además, se requiere que pueda volcarse para retirar su contenido rápidamente.
- Diseñar un mejor método de filtración para la separación de la piel de atún y las diferentes fracciones líquidas durante el proceso, de tal manera que se reduzca su tiempo de separación y se aproxime al tiempo que toma esta operación a nivel de laboratorio.
- Evaluar el proceso a escala de planta piloto con las mejoras propuestas, realizando un mayor número de repeticiones.
- Evaluar el efecto de eliminar las filtraciones con las membranas de 0,8 μm , 100 nm y 50 nm (una, dos o las tres) sobre la selectividad y el rendimiento de la UF utilizando la membrana de 20 nm.
- Aplicar diafiltración a las fracciones de los retenidos, para disminuir la proporción de proteínas con pesos moleculares menores a los 75 kDa y evaluar su efecto sobre las propiedades de gelificación.
- Evaluar procesos de MF/UF utilizando electromembranas con el fin de fraccionar el licor de pescado sin necesidad de aplicar tratamientos enzimáticos, ya que permiten separar moléculas de peso molecular similares, para obtener mejores propiedades gelificantes de la gelatina extraída de la piel de atún.
- Evaluar el efecto de variar la presión transmembranaria y la velocidad tangencial sobre el rendimiento y la productividad de los procesos membranarios.

VII. REFERENCIAS

- Abdelmalek, B.E., J. Gómez-Estaca, A. Sila, O. Martínez-Alvarez, M.C. Gómez-Guillén, S. Chaabouni-Ellouz, et al. 2016. Characteristics and functional properties of gelatin extracted from squid (*Loligo vulgaris*) skin. LWT - Food Science and Technology 65: 924-931. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.024>.
- Abejón, R., A. Abejón, A. Garea, T. Tsuru, A. Irabien, M.P. Belleville, et al. 2016. In Silico Evaluation of ultrafiltration and nanofiltration membrane cascades for continuous fractionation of protein hydrolysate from tuna processing byproduct. Industrial & Engineering Chemistry Research 55: 7493-7504. doi:10.1021/acs.iecr.6b01495.
- Afonso, M.D. y R. Bórquez. 2002. Review of the treatment of seafood processing wastewaters and recovery of proteins therein by membrane separation processes — prospects of the ultrafiltration of wastewaters from the fish meal industry. Desalination 142: 29-45. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0011-9164\(01\)00423-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0011-9164(01)00423-4).
- Ahmad, M. y S. Benjakul. 2011. Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. Food Hydrocolloids 25: 381-388. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.07.004>.
- Ahmad, T., A. Ismail, S.A. Ahmad, K.A. Khalil, Y. Kumar, K.D. Adeyemi, et al. 2017. Recent advances on the role of process variables affecting gelatin yield and characteristics with special reference to enzymatic extraction: A review. Food Hydrocolloids 63: 85-96. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.007>.
- Ahn, C.-B., J.-Y. Je y Y.-S. Cho. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. Food Research International 49: 92-98. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.002>.
- Ahn, C.-B., J.-G. Kim y J.-Y. Je. 2014. Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. Food Chemistry 147: 78-83. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.136>.
- AOAC. 1999. Official methods of analysis 16a ed. Método 981.12. Association of Official Analytical Chemists, Maryland.
- AOAC. 2005. Official methods of analysis 18a ed. Métodos 920.152, 920.152 y 940.26. Association of Official Analytical Chemists, Maryland.
- Arnesen, J.A. y A. Gildberg. 2007. Extraction and characterisation of gelatine from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. Bioresource technology 98: 53-57. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.021>.

- Arvanitoyannis, I.S. y A. Kassaveti. 2008. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science & Technology* 43: 726-745. doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01513.x.
- Asghar, A. y R.L. Henrickson. 1982. Chemical, biochemical, functional, and nutritional characteristics of collagen in food systems. In: Chichester, editor *Advances in Food Research*. Academic Press. p. 231-372.
- Badii, F. y N.K. Howell. 2006. Fish gelatin: Structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloids* 20: 630-640. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.06.006>.
- Batista, I., C. Ramos, J. Coutinho, N.M. Bandarra y M.L. Nunes. 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry* 45: 18-24. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2009.07.019>.
- Baziwane, D. y Q. He. 2003. Gelatin: the paramount food additive. *Food Reviews International* 19: 423-435. doi:10.1081/FRI-120025483.
- Beaulieu, L., J. Thibodeau, C. Bonnet, P. Bryl y M.-É. Carbonneau. 2013. Detection of antibacterial activity in an enzymatic hydrolysate fraction obtained from processing of Atlantic rock crab (*Cancer irroratus*) by-products. *PharmaNutrition* 1: 149-157. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.phanu.2013.05.004>.
- Beaulieu, L., J. Thibodeau, P. Bryl y M.-É. Carbonneau. 2009. Characterization of enzymatic hydrolyzed snow crab (*Chionoecetes opilio*) by-product fractions: A source of high-valued biomolecules. *Bioresource Technology* 100: 3332-3342. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.073>.
- Bechtel, P.J. 2003. Properties of different fish processing by-products from pollock, cod and salmon. *Journal of Food Processing and Preservation* 27: 101-116. doi:10.1111/j.1745-4549.2003.tb00505.x.
- Ben Khaled, H., Z. Ghlissi, Y. Chtourou, A. Hakim, N. Ktari, M.A. Fatma, et al. 2012. Effect of protein hydrolysates from sardinelle (*Sardinella aurita*) on the oxidative status and blood lipid profile of cholesterol-fed rats. *Food Research International* 45: 60-68. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.003>.
- Benhabiles, M.S., N. Abdi, N. Drouiche, H. Lounici, A. Pauss, M.F.A. Goosen, et al. 2012. Fish protein hydrolysate production from sardine solid waste by crude pepsin enzymatic hydrolysis in a bioreactor coupled to an ultrafiltration unit. *Materials Science and Engineering: C* 32: 922-928. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.02.013>.
- Benjakul, S., K. Oungbho, W. Visessanguan, Y. Thiansilakul y S. Roytrakul. 2009. Characteristics of gelatin from the skins of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*. *Food Chemistry* 116: 445-451. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.063>.

- Bhattacharjee, C., V.K. Saxena y S. Dutta. 2017. Fruit juice processing using membrane technology: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 43: 136-153. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.08.002>.
- Bougatef, A., R. Balti, A. Sila, R. Nasri, G. Graiaa y M. Nasri. 2012. Recovery and physicochemical properties of smooth hound (*mustelus mustelus*) skin gelatin. *LWT - Food Science and Technology* 48: 248-254. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.021>.
- Bougatef, A., N. Nedjar-Arroume, L. Manni, R. Ravallec, A. Barkia, D. Guillochon, et al. 2010. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry* 118: 559-565. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.021>.
- Bourseau, P., L. Vandanjon, P. Jaouen, M. Chaplain-Derouiniot, A. Massé, F. Guérard, et al. 2009. Fractionation of fish protein hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration: impact on peptidic populations. *Desalination* 244: 303-320. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2008.05.026>.
- Bueno-Solano, C., J. López-Cervantes, O.N. Campas-Baypoli, R. Lauterio-García, N.P. Adan-Bante y D.I. Sánchez-Machado. 2009. Chemical and biological characteristics of protein hydrolysates from fermented shrimp by-products. *Food Chemistry* 112: 671-675. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.029>.
- Cardoso, C. y M.L. Nunes. 2013. Improved Utilization of Fish Waste, Discards and By-products and Low-value Fish towards Food and Health Products. *Utilization of Fish Waste*. CRC Press, Boca Ratón, Florida. p. 26-58.
- Carneiro, L., I. dos Santos Sa, F. dos Santos Gomes, V.M. Matta y L.M.C. Cabral. 2002. Cold sterilization and clarification of pineapple juice by tangential microfiltration. *Desalination* 148: 93-98. doi:[https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00659-8](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00659-8).
- Carpenter, D.E., Ngeh-Ngwainbi, J. y Lee, S. 1992. Lipid Analysis. In Sullivan D.M. y Carpenter, D.E. eds. *Methods of analysis for nutritional labeling*. Association of Official Analytical Chemists, Arlington. p. 84-105.
- Castro-Ceseña, A.B., M. del Pilar Sánchez-Saavedra y F.J. Márquez-Rocha. 2012. Characterisation and partial purification of proteolytic enzymes from sardine by-products to obtain concentrated hydrolysates. *Food Chemistry* 135: 583-589. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.024>.
- Chacón-Villalobos, A. 2006. *Tecnologías de membranas en la agroindustria láctea*. *Agronomía Mesoamericana* 17: 21.
- Chakrabarti, R. 2005. *Enzymatic Bioprocessing of Tropical Seafood Wastes*. *Food Biotechnology, Second Edition*. CRC Press.
- Chalamaiah, M., B. Dinesh kumar, R. Hemalatha y T. Jyothirmayi. 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities

and applications: A review. Food Chemistry 135: 3020-3038.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100>.

- Chandra, M.V. y B.A. Shamasundar. 2015. Rheological properties of gelatin prepared from the swim bladders of freshwater fish *Catla catla*. Food Hydrocolloids 48: 47-54. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.01.022>.
- Chandrasekaran, M. 2012. Future Prospects and The Need for Research. Valorization of Food Processing By-Products. CRC Press. p. 757-772.
- Chen, S., L. Tang, W. Su, W. Weng, K. Osako y M. Tanaka. 2015. Separation and characterization of alpha-chain subunits from tilapia (*Tilapia zillii*) skin gelatin using ultrafiltration. Food Chemistry 188: 350-356.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.084>.
- Cherkasov, A.N. y A.E. Polotsky. 1996. The resolving power of ultrafiltration. Journal of Membrane Science 110: 79-82. doi:[https://doi.org/10.1016/0376-7388\(95\)00233-2](https://doi.org/10.1016/0376-7388(95)00233-2).
- Cheryan, M. 1998. Ultrafiltration and microfiltration handbook. CRC Press, Florida. p. 552.
- Cheryan, M. 2006. Membrane Concentration of Liquid Foods. Handbook of Food Engineering, Second Edition. CRC Press. p. 553-599.
- Chi, C.-F., F.-Y. Hu, B. Wang, X.-J. Ren, S.-G. Deng y C.-W. Wu. 2015. Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolyzate of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*) muscle. Food Chemistry 168: 662-667.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.117>.
- Chi, C.-F., B. Wang, Y.-Y. Deng, Y.-M. Wang, S.-G. Deng y J.-Y. Ma. 2014. Isolation and characterization of three antioxidant pentapeptides from protein hydrolysate of monkfish (*Lophius litulon*) muscle. Food Research International 55: 222-228.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.11.018>.
- Cho, S.-H., M.L. Jahnncke, K.-B. Chin y J.-B. Eun. 2006. The effect of processing conditions on the properties of gelatin from skate (*Raja Kenojei*) skins. Food Hydrocolloids 20: 810-816. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.08.002>.
- Cho, S.M., Y.S. Gu y S.B. Kim. 2005. Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. Food Hydrocolloids 19: 221-229.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.05.005>.
- Chowdhury, P., T. Viraraghavan y A. Srinivasan. 2010. Biological treatment processes for fish processing wastewater – A review. Bioresource Technology 101: 439-449.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.065>.
- Costa, C.A.E., P.C.R. Pinto y A.E. Rodrigues. 2018. Lignin fractionation from *E. Globulus* kraft liquor by ultrafiltration in a three stage membrane sequence. Separation and

- Purification Technology 192: 140-151.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.09.066>.
- Cozzano, S. 2007. Impacto del proceso de microfiltración tangencial sobre el valor de la mora (*Rubus* spp) como alimento funcional. Universidad de Costa Rica, San José.
- Crowley, S.V., V. Caldeo, N.A. McCarthy, M.A. Fenelon, A.L. Kelly y J.A. O'Mahony. 2015. Processing and protein-fractionation characteristics of different polymeric membranes during filtration of skim milk at refrigeration temperatures. International Dairy Journal 48: 23-30.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.005>.
- Cuperus, F.P. y H.H. Nijhuis. 1993. Applications of membrane technology to food processing. Trends in Food Science & Technology 4: 277-282.
doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0924-2244\(93\)90070-Q](http://dx.doi.org/10.1016/0924-2244(93)90070-Q).
- D'Souza, N.M. y A.J. Mawson. 2005. Membrane cleaning in the dairy industry: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 45: 125-134.
doi:10.1080/10408690490911783.
- da Silva, E.V.C., L.d.F.H. Lourenço y R.S. Pena. 2017. Optimization and characterization of gelatin from kumakuma (*Brachyplatystoma filamentosum*) skin. CyTA - Journal of Food 15: 361-368. doi:10.1080/19476337.2016.1266391.
- Darine, S., V. Christophe y D. Gholamreza. 2010. Production and functional properties of beef lung protein concentrates. Meat Science 84: 315-322.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.03.007>.
- Diná Afonso, M., J. Ferrer y R. Bórquez. 2004. An economic assessment of proteins recovery from fish meal effluents by ultrafiltration. Trends in Food Science & Technology 15: 506-512. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.008>.
- Díaz-Calderón, P., E. Flores, A. González-Muñoz, M. Pepczynska, F. Quero y J. Enrione. 2017. Influence of extraction variables on the structure and physical properties of salmon gelatin. Food Hydrocolloids 71: 118-128.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.004>.
- Eysturskarð, J., I.J. Haug, N. Elharfaoui, M. Djabourov y K.I. Draget. 2009a. Structural and mechanical properties of fish gelatin as a function of extraction conditions. Food Hydrocolloids 23: 1702-1711.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.008>.
- Eysturskarð, J., I.J. Haug, A.-S. Ulset y K.I. Draget. 2009b. Mechanical properties of mammalian and fish gelatins based on their weight average molecular weight and molecular weight distribution. Food Hydrocolloids 23: 2315-2321.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.06.007>.
- Fan, H., M.-J. Dumont y B.K. Simpson. 2017. Extraction of gelatin from salmon (*Salmo salar*) fish skin using trypsin-aided process: optimization by Plackett-Burman and

response surface methodological approaches. *Journal of Food Science and Technology* 54: 4000-4008. doi:10.1007/s13197-017-2864-5.

- FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016, Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. D.d.P.y. Acuicultura, , Roma. p. 224.
- FAO. 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. In: D. d. P. y. Acuicultura, editor Roma. p. 233.
- FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. In: D. d. P. y. Acuicultura, editor Roma. p. 251.
- FAO. 2014. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. Oportunidades y desafíos. In: D. d. P. y. Acuicultura, editor Roma. p. 253.
- Ferraro, V., I.B. Cruz, R.F. Jorge, F.X. Malcata, M.E. Pintado y P.M.L. Castro. 2010. Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: A review. *Food Research International* 43: 2221-2233. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.034>.
- Galla, N.R., P.R. Pamidighantam, S. Akula y B. Karakala. 2012. Functional properties and in vitro antioxidant activity of roe protein hydrolysates of *Channa striatus* and *Labeo rohita*. *Food Chemistry* 135: 1479-1484. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.098>.
- GEA. 2007. Filtración por Membranas: Osmosis Inversa, Nanofiltración, Ultrafiltración y Microfiltración. .
- Gildberg, A., J.A. Arnesen, B.-S. Sæther, J. Rauø y E. Stenberg. 2011. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in a hydrolysate of proteins from Northern shrimp (*Pandalus borealis*) and identification of two novel inhibitory tri-peptides. *Process Biochemistry* 46: 2205-2209. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.08.003>.
- Giménez, B., J. Turnay, M.A. Lizarbe, P. Montero y M.C. Gómez-Guillén. 2005. Use of lactic acid for extraction of fish skin gelatin. *Food Hydrocolloids* 19: 941-950. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.09.011>.
- Girard, B., L.R. Fukumoto y S. Sefa Koseoglu. 2000. Membrane Processing of Fruit Juices and Beverages: A Review. *Critical Reviews in Biotechnology* 20: 109-175. doi:10.1080/07388550008984168.
- Girgih, A.T., C.C. Udenigwe, F.M. Hasan, T.A. Gill y R.E. Aluko. 2013. Antioxidant properties of Salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. *Food Research International* 52: 315-322. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.034>.
- Gómez-Guillén, M.C., B. Giménez y P. Montero. 2005. Extraction of gelatin from fish skins by high pressure treatment. *Food Hydrocolloids* 19: 923-928. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2004.12.011>.

- Gómez-Guillén, M.C., J. Turnay, M.D. Fernández-Díaz, N. Ulmo, M.A. Lizarbe y P. Montero. 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids* 16: 25-34. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00035-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00035-2).
- Gowthaman, M.K., P. Gowthaman y M. Chandrasekaran. 2012. Principles of Food Technology and Types of Food Waste Processing Technologies. Valorization of Food Processing By-Products. CRC Press. p. 109-146.
- Grand View Research. 2016. Gelatin market size expected to reach \$4.08 billion by 2024. In: G. V. Research, editor.
- Gudmundsson, M. y H. Hafsteinsson. 1997. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. *Journal of Food Science* 62: 37-39. doi:10.1111/j.1365-2621.1997.tb04363.x.
- Gustavson, K. 1956. The chemistry and reactivity of collagen, New York.
- Gutiérrez-Pulido, H. y R. de la Vara-Salazar. 2008. Análisis y diseño de experimentos. 2 ed. McGraw Hill Interamericana, México.
- Hao, S., L. Li, X. Yang, J. Cen, H. Shi, Q. Bo, et al. 2009. The characteristics of gelatin extracted from sturgeon (*Acipenser baeri*) skin using various pretreatments. *Food Chemistry* 115: 124-128. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.080>.
- Haug, I.J. y K.I. Draget. 2009. 6 - Gelatin. *Handbook of Hydrocolloids (Second edition)*. Woodhead Publishing. p. 142-163.
- Haug, I.J., K.I. Draget y O. Smidsrød. 2004. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids* 18: 203-213. doi:[https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(03\)00065-1](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(03)00065-1).
- He, S., C. Franco y W. Zhang. 2013. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International* 50: 289-297. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.031>.
- Herpandi, N.H., A. Rosma and W.A. Wan Nadiah. 2011. The Tuna Fishing Industry: A New Outlook on Fish Protein Hydrolysates. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10: 195-207. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00155.x.
- Hodúr, C., S. Kertész, S. Beszédes, Z. László y G. Szabó. 2009. Concentration of marc extracts by membrane techniques. *Desalination* 241: 265-271. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2007.12.053>.
- Hou, H., Y. Fan, B. Li, C. Xue, G. Yu, Z. Zhang, et al. 2012. Purification and identification of immunomodulating peptides from enzymatic hydrolysates of Alaska pollock frame. *Food Chemistry* 134: 821-828. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.186>.

- Huang, S.-L., C.-L. Jao, K.-P. Ho y K.-C. Hsu. 2012. Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates. *Peptides* 35: 114-121. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.03.006>.
- Intarasirisawat, R., S. Benjakul, W. Visessanguan y J. Wu. 2012. Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. *Food Chemistry* 135: 3039-3048. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.076>.
- Intarasirisawat, R., S. Benjakul, J. Wu y W. Visessanguan. 2013. Isolation of antioxidative and ACE inhibitory peptides from protein hydrolysate of skipjack (*Katsuwana pelamis*) roe. *Journal of Functional Foods* 5: 1854-1862. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.09.006>.
- Ionics Inc. 2004. Membrane technology benefits the food processing industry. *Filtration & Separation* 41: 32-33. doi:[https://doi.org/10.1016/S0015-1882\(05\)00411-8](https://doi.org/10.1016/S0015-1882(05)00411-8).
- Je, J.-Y., P.-J. Park y S.-K. Kim. 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Research International* 38: 45-50. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2004.07.005>.
- Jellouli, K., R. Balti, A. Bougatef, N. Hmidet, A. Barkia y M. Nasri. 2011. Chemical composition and characteristics of skin gelatin from grey triggerfish (*Balistes capricus*). *LWT - Food Science and Technology* 44: 1965-1970. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.005>.
- Jemil, I., M. Jridi, R. Nasri, N. Ktari, R. Ben Slama-Ben Salem, M. Mehiri, et al. 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochemistry* 49: 963-972. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.004>.
- Jeon, Y.-J., H.-G. Byun y S.-K. Kim. 1999. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry* 35: 471-478. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00098-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00098-9).
- Jongjareonrak, A., S. Rawdkuen, M. Chaijan, S. Benjakul, K. Osako y M. Tanaka. 2010. Chemical compositions and characterisation of skin gelatin from farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*). *LWT - Food Science and Technology* 43: 161-165. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.012>.
- Jridi, M., R. Nasri, R. Ben Slama-Ben Salem, I. Lassoued, A. Barkia, M. Nasri, et al. 2015. Chemical and biophysical properties of gelatins extracted from the skin of octopus (*Octopus vulgaris*). *LWT - Food Science and Technology* 60: 881-889. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.057>.
- Kader, M.A. y S. Koshio. 2012. Effect of composite mixture of seafood by-products and soybean proteins in replacement of fishmeal on the performance of red sea bream,

Pagrus major. *Aquaculture* 368–369: 95-102.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.09.014>.

- Kaewruang, P., S. Benjakul y T. Prodpran. 2013a. Molecular and functional properties of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket as affected by extracting temperatures. *Food Chemistry* 138: 1431-1437.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.114>.
- Kaewruang, P., S. Benjakul, T. Prodpran y S. Nalinanon. 2013b. Physicochemical and functional properties of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as affected by extraction conditions. *Food Bioscience* 2: 1-9.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2013.03.002>.
- Karayannakidis, P.D., S.E. Chatziantoniou y A. Zotos. 2014. Effects of selected process parameters on physical and sensorial properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin. *Journal of Food Process Engineering* 37: 461-473.
doi:10.1111/jfpe.12103.
- Karayannakidis, P.D. y A. Zotos. 2015. Physicochemical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin and its modification by the addition of various coenhancers. *Journal of Food Processing and Preservation* 39: 530-538.
doi:10.1111/jfpp.12258.
- Karayannakidis, P.D. y A. Zotos. 2016. Fish processing by-products as a potential source of gelatin: a review. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 25: 65-92.
doi:10.1080/10498850.2013.827767.
- Karim, A.A. y R. Bhat. 2008. Gelatin alternatives for the food industry: recent developments, challenges and prospects. *Trends in Food Science & Technology* 19: 644-656. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2008.08.001>.
- Karim, A.A. y R. Bhat. 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids* 23: 563-576.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.002>.
- Kim, J.-S., G. Peters y C. DeWitt. 2013. Food-grade coproducts from surimi processing. *surimi and surimi seafood*, Third Edition. CRC Press. p. 341-360.
- Kim, S.-K. y E. Mendis. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. *Food Research International* 39: 383-393.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2005.10.010>.
- Kittiphattanabawon, P., S. Benjakul, S. Sinthusamran y H. Kishimura. 2016. Gelatin from clown featherback skin: Extraction conditions. *LWT - Food Science and Technology* 66: 186-192. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.029>.
- Kittiphattanabawon, P., S. Benjakul, W. Visessanguan y F. Shahidi. 2010. Comparative study on characteristics of gelatin from the skins of brownbanded bamboo shark and blacktip shark as affected by extraction conditions. *Food Hydrocolloids* 24: 164-171. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.09.001>.

- Klompong, V., S. Benjakul, D. Kantachote y F. Shahidi. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chemistry 102: 1317-1327. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016>.
- Korzeniowska, M., I.W.Y. Cheung y E.C.Y. Li-Chan. 2013. Effects of fish protein hydrolysate and freeze-thaw treatment on physicochemical and gel properties of natural actomyosin from Pacific cod. Food Chemistry 138: 1967-1975. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.150>.
- Kołodziejka, I., E. Skierka, M. Sadowska, W. Kołodziejki y C. Niecikowska. 2008. Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. Food Chemistry 107: 700-706. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.071>.
- Kristinsson, H.G. y B.A. Rasco. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 40: 43-81. doi:10.1080/10408690091189266.
- Ktari, N., M. Jridi, R. Nasri, I. Lassoued, H. Ben Ayed, A. Barkia, et al. 2014. Characteristics and functional properties of gelatin from zebra blenny (*Salaria basilisca*) skin. LWT - Food Science and Technology 58: 602-608. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.03.036>.
- Kuca, M. y D. Szaniawska. 2009. Application of microfiltration and ceramic membranes for treatment of salted aqueous effluents from fish processing. Desalination 241: 227-235. doi:<https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.01.068>.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the essembly of head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Lafarga, T. y M. Hayes. 2014. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. Meat Science 98: 227-239. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.036>.
- Lassoued, I., L. Mora, R. Nasri, M. Aydi, F. Toldrá, M.-C. Aristoy, et al. 2015. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. Journal of Proteomics 128: 458-468. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.05.007>.
- Lee, K.-J., M.S. Powell, F.T. Barrows, S. Smiley, P. Bechtel y R.W. Hardy. 2010a. Evaluation of supplemental fish bone meal made from Alaska seafood processing byproducts and dicalcium phosphate in plant protein based diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 302: 248-255. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.02.034>.
- Lee, S.-H., Z.-J. Qian y S.-K. Kim. 2010b. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. Food Chemistry 118: 96-102. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.086>.

- Levin, M. 2016. Chapter 1 - Scale-up basics. How to scale-up a wet granulation end point scientifically. Academic Press, Boston. p. 1-2.
- Lin, L., S. Lv y B. Li. 2012. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory and antihypertensive properties of squid skin gelatin hydrolysates. *Food Chemistry* 131: 225-230. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.064>.
- Lin, L., J.M. Regenstein, S. Lv, J. Lu y S. Jiang. 2017. An overview of gelatin derived from aquatic animals: Properties and modification. *Trends in Food Science & Technology* 68: 102-112. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.012>.
- Liu, D., G. Wei, T. Li, J. Hu, N. Lu, J.M. Regenstein, et al. 2015. Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry* 172: 836-843. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.147>.
- Liu, Y., X. Li, Z. Chen, J. Yu, F. Wang y J. Wang. 2014. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. *Food Chemistry* 151: 459-465. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.089>.
- Lopes, C., L.T. Antelo, A. Franco-Uría, A.A. Alonso y R. Pérez-Martín. 2015. Valorisation of fish by-products against waste management treatments – Comparison of environmental impacts. *Waste Management* 46: 103-112. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2015.08.017>.
- López-Caballero, M.E., B. Giménez, M.C. Gómez-Guillén y P. Montero. 2013. Valorization and integral use of seafood by-products. *Engineering Aspects of Food Biotechnology*. CRC Press. p. 367-412.
- McClements, D.J. 2015. Emulsion ingredients. *Food emulsions*. CRC Press, Boca Ratón. p. 99-184.
- Mezger, T. 2013. *The rheology handbook : for users of rotational and oscillatory rheometers*. 3rd ed. Vincentz Network, Hannover.
- Mireles DeWitt, C.A., J.T.M. Lin y A. Ismond. 2013. Waste management, utilization, and challenges. *Surimi and surimi seafood, Third Edition*. CRC Press. p. 313-340.
- Mittal, B. 2017. Chapter 7 - Process scale-up, tech-transfer, and optimization. In: B. Mittal, editor *How to develop robust solid oral dosage forms from conception to post-approval*. Academic Press. p. 137-153.
- Nagarajan, M., S. Benjakul, T. Prodpran, P. Songtipya y H. Kishimura. 2012. Characteristics and functional properties of gelatin from splendid squid (*Loligo formosana*) skin as affected by extraction temperatures. *Food Hydrocolloids* 29: 389-397. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.04.001>.

- Najafian, L. y A.S. Babji. 2012. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. *Peptides* 33: 178-185. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2011.11.013>.
- Nikoo, M., S. Benjakul, M. Bashari, M. Alekhorshied, A. Idrissa Cissouma, N. Yang, et al. 2014. Physicochemical properties of skin gelatin from farmed Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) as influenced by acid pretreatment. *Food Bioscience* 5: 19-26. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2013.10.004>.
- Ninan, G., A.A. Zynudheen, C.G. Joshy y K.S. Yousuf. 2013. Physical, chemical and functional properties of gelatin extracted from the skin of rohu, *Labeo rohita* and yellowfin tuna, *Thunnus albacares*. *Indian Journal of Fisheries* 60: 6.
- Niu, L., X. Zhou, C. Yuan, Y. Bai, K. Lai, F. Yang, et al. 2013. Characterization of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin extracted with alkaline and different acid pretreatments. *Food Hydrocolloids* 33: 336-341. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.04.014>.
- Norziah, M.H., A. Al-Hassan, A.B. Khairulnizam, M.N. Mordi y M. Norita. 2009. Characterization of fish gelatin from surimi processing wastes: Thermal analysis and effect of transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocolloids* 23: 1610-1616. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.12.004>.
- Owolabi, R.U., M.A. Usman y A.J. Kehinde. 2018. Modelling and optimization of process variables for the solution polymerization of styrene using response surface methodology. *Journal of King Saud University - Engineering Sciences* 30: 22-30. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jksues.2015.12.005>.
- Pabby, A.E., S.E. Rizvi y A.E. Requena. 2015. *Handbook of membrane separations*. CRC Press, Boca Raton.
- Parikh, D.M. 2017. Chapter 11 - Process scale-up. How to optimize fluid bed processing technology. Academic Press. p. 127-150.
- Patras, A., B.D. Oomah y E. Gallagher. 2011. 12 - By-product utilization. In: B. K. T. G. McKenna, editor *Pulse Foods*. Academic Press, San Diego. p. 325-362.
- Paulson, D.J., R.L. Wilson y D.D. Spatz. 1984. Crossflow membrane technology and its applications. *Food Technology* 38: 11.
- Penven, A., R. Pérez Gálvez y J.-P. Bergé. 2013. *By-products from Fish Processing. Utilization of Fish Waste*. CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 1-25.
- Pires, C. y I. Batista. 2013. Functional properties of fish protein hydrolysates. *Utilization of fish waste*. CRC Press. p. 59-75.
- Pranoto, Y., D.W. Marseno y H. Rahmawati. 2011. Characteristics of gelatins extracted from fresh and sun-dried seawater fish skins in Indonesia. *International Food Research Journal* 18: 6.

- Pértile, P., D. Holthusen, P.I. Gubiani y J.M. Reichert. 2018. Microstructural strength of four subtropical soils evaluated by rheometry: properties, difficulties and opportunities. *Scientia Agricola* 75: 154-162.
- Rahman, M.S., G.S. Al-Saidi y N. Guizani. 2008. Thermal characterisation of gelatin extracted from yellowfin tuna skin and commercial mammalian gelatin. *Food Chemistry* 108: 472-481. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.079>.
- Ranadheera, C.S. y K.V. Janak. 2014. Food applications of by-products from the sea. *seafood science*. CRC Press. p. 376-396.
- Riaz, M. y M. Chaudry. 2003. *Gelatin in Halal Food Production*. Halal Food Production. CRC Press.
- Sabeena Farvin, K.H., L.L. Andersen, H.H. Nielsen, C. Jacobsen, G. Jakobsen, I. Johansson, et al. 2014. Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. *Food Chemistry* 149: 326-334. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.075>.
- Safari, M., R. Abdi, M. Adl y J. Kafashan. 2018. Optimization of biogas productivity in lab-scale by response surface methodology. *Renewable Energy* 118: 368-375. doi:<https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.11.025>.
- Saidi, S., A. Deratani, M.-P. Belleville y R. Ben Amar. 2014. Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process. *Food Research International* 65, Part C: 329-336. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.023>.
- Saidi, S., A. Deratani, R. Ben Amar y M.-P. Belleville. 2013. Fractionation of a tuna dark muscle hydrolysate by a two-step membrane process. *Separation and Purification Technology* 108: 28-36. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2013.01.048>.
- Sanmartín, E., J.C. Arboleya, I. Iloro, K. Escuredo, F. Elortza y F.J. Moreno. 2012. Proteomic analysis of processing by-products from canned and fresh tuna: Identification of potentially functional food proteins. *Food Chemistry* 134: 1211-1219. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.177>.
- Sarabia, A.I., M.C. Gómez-Guillén y P. Montero. 2000. The effect of added salts on the viscoelastic properties of fish skin gelatin. *Food Chemistry* 70: 71-76. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00073-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00073-X).
- Saravacos, G. y Z. Maroulis. 2003. *Food process design*. CRC Press, Boca Raton.
- Saxena, A., B.P. Tripathi, M. Kumar y V.K. Shahi. 2009. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. *Advances in Colloid and Interface Science* 145: 1-22. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2008.07.004>.
- Scott, D., T. Bowser y W. McGlynn. 2017. Scaling up your food process. In: R. M. K. F. A. P. Center, editor *food technology fact sheet*. Oklahoma.

- Serna-Cock, L., M. Velásquez y A.A. Ayala. 2010. Efecto de la ultrafiltración sobre las propiedades reológicas de gelatina comestible de origen bovino. *Información tecnológica* 21: 91-102.
- Shahidi, F., E. Mendis y S.-K. Kim. 2007. Marine fisheries by-products as potential nutraceuticals. *Marine nutraceuticals and functional foods*. CRC Press. p. 1-22.
- Sheriff, S.A., B. Sundaram, B. Ramamoorthy y P. Ponnusamy. 2014. Synthesis and in vitro antioxidant functions of protein hydrolysate from backbones of *Rastrelliger kanagurta* by proteolytic enzymes. *Saudi Journal of Biological Sciences* 21: 19-26. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2013.04.009>.
- Shi, S., Y.-H. Lee, S.-H. Yun, P.V.X. Hung and S.-H. Moon. 2010. Comparisons of fish meat extract desalination by electro dialysis using different configurations of membrane stack. *Journal of Food Engineering* 101: 417-423. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.07.031>.
- Sila, A., O. Martinez-Alvarez, A. Haddar, M.C. Gómez-Guillén, M. Nasri, M.P. Montero, et al. 2015. Recovery, viscoelastic and functional properties of Barbel skin gelatine: Investigation of anti-DPP-IV and anti-prolyl endopeptidase activities of generated gelatine polypeptides. *Food Chemistry* 168: 478-486. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.086>.
- Sila, A., O. Martinez-Alvarez, F. Krichen, M.C. Gómez-Guillén y A. Bougatef. 2017. Gelatin prepared from European eel (*Anguilla anguilla*) skin: Physicochemical, textural, viscoelastic and surface properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 529: 643-650. doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.06.032>.
- Silva, J.F.X., K. Ribeiro, J.F. Silva, T.B. Cahú y R.S. Bezerra. 2014. Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. *Animal Feed Science and Technology* 196: 96-106. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.06.010>.
- Simon, A., L. Vandanjon, G. Levesque y P. Bourseau. 2002. Concentration and desalination of fish gelatin by ultrafiltration and continuous diafiltration processes. *Desalination* 144: 313-318. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0011-9164\(02\)00333-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00333-8).
- Sinthusamran, S., S. Benjakul y H. Kishimura. 2014. Characteristics and gel properties of gelatin from skin of seabass (*Lates calcarifer*) as influenced by extraction conditions. *Food Chemistry* 152: 276-284. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.109>.
- Sinthusamran, S., S. Benjakul y H. Kishimura. 2015. Molecular characteristics and properties of gelatin from skin of seabass with different sizes. *International journal of biological macromolecules* 73: 146-153. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.024>.

- Soto, M. 2014. Obtención de un extracto de polifelones rico en elagitaninos mediante la aplicación de tecnologías de membrana a partir de un subproducto obtenido del procesamiento industrial de mora. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Sousa, S., J. Vázquez, R. Pérez-Martín, A. Carvalho y A. Gomes. 2017. Valorization of by-products from commercial fish species: extraction and chemical properties of skin gelatins. *Molecules* 22: 1545.
- Suresh, P.V. y G.N. Prabhu. 2012. *Seafood. Valorization of Food Processing By-Products*. CRC Press. p. 685-736.
- Surh, J., E.A. Decker y D.J. McClements. 2006. Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin. *Food Hydrocolloids* 20: 596-606.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.06.002>.
- Suwal, S., C. Roblet, A. Doyen, J. Amiot, L. Beaulieu, J. Legault, et al. 2014. Electrodialytic separation of peptides from snow crab by-product hydrolysate: Effect of cell configuration on peptide selectivity and local electric field. *Separation and Purification Technology* 127: 29-38.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2014.02.018>.
- Tabarestani, H.S., Y. Maghsoudlou, A. Motamedzadegan y A.R. Sadeghi Mahoonak. 2010. Optimization of physico-chemical properties of gelatin extracted from fish skin of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Bioresource technology* 101: 6207-6214. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.071>.
- Tahergorabi, R., S.V. Hosseini y J. Jaczynski. 2011. 6 - Seafood proteins. In: G. O. Phillips and P. A. Williams, editors, *Handbook of Food Proteins*. Woodhead Publishing. p. 116-149.
- te Nijenhuis, K. 1997. Gelatin. In: K. te Nijenhuis, editor *Thermoreversible networks: viscoelastic properties and structure of gels*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. p. 160-193.
- Tewari, P.K. 2015. *Membrane Technology. Nanocomposite Membrane Technology*. CRC Press. p. 1-68.
- Thankappan, T.K., G. George y K.G.R. Nair, editor. 1998. Utilization of tuna and tuna waste. Hameed, M.S.Kurup, B.M. ed. *Technological Advancement in Fish*. Cochin: University of Science and Technology.
- Unal, O. 2016. Optimization of shot peening parameters by response surface methodology. *Surface and Coatings Technology* 305: 99-109.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2016.08.004>.
- Vaillant, F., A. Millan, M. Dornier, M. Decloux y M. Reynes. 2001. Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. *Journal of Food Engineering* 48: 83-90.
doi:[https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00152-7).

- Vaillant, F., A.M. Pérez y F. Viquez. 2004. Microfiltración tangencial: Una alternativa innovadora para la transformación de frutas tropicales. *La Alimentación Latinoamericana* 252: 8.
- van Reis, R., S. Gadam, N. Frautschy Leah, S. Orlando, M. Goodrich Elizabeth, S. Saksena, et al. 2000. High performance tangential flow filtration. *Biotechnology and Bioengineering* 56: 71-82. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19971005)56:1<71::AID-BIT8>3.0.CO;2-S.
- Vazhiyil, V. 2008. *Seafood Proteins. Marine products for healthcare*. CRC Press. p. 51-101.
- Venugopal, V. y Mazza, G. 2008. *Seafood proteins: functional properties and protein supplements. Marine products for healthcare*. CRC Press. p. 103-142.
- Wang, Q., W. Li, Y. He, D. Ren, F. Kow, L. Song, et al. 2014. Novel antioxidative peptides from the protein hydrolysate of oysters (*Crassostrea talienwhanensis*). *Food Chemistry* 145: 991-996. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.099>.
- Wasswa, J., J. Tang y X. Gu. 2007. Utilization of fish processing by-products in the gelatin industry. *Food Reviews International* 23: 159-174. doi:10.1080/87559120701225029.
- Yanan, Z., Z. Li, L. Hua, S. Wei y Y. Meilan. 2012. Effect of eel head protein hydrolysates on the denaturation of grass carp surimi during frozen storage. *Procedia Engineering* 37: 223-228. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2012.04.231>.
- Yoo, S.-J., S.-M. Cho, J.-W. Woo, S.-H. Kim, S.-H. Byun, T.-W. Kim, et al. 2008. Physicochemical Characteristics of Gelatin from Abdominal Skin of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*). *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 41: 7.
- Yoon, S.-H. 2015. *Membrane process. Membrane bioreactor processes*. CRC Press. p. 51-96.
- Young, S., M. Wong, Y. Tabata y A.G. Mikos. 2005. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release* 109: 256-274. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.023>.
- Zhang, Q., Q. Wang, S. Lv, J. Lu, S. Jiang, J.M. Regenstein, et al. 2016. Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Food Bioscience* 13: 41-48. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.005>.
- Zhang, Y., X. Duan y Y. Zhuang. 2012. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. *Peptides* 38: 13-21. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.014>.
- Zhong, S., C. Ma, Y.C. Lin y Y. Luo. 2011. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein

hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. Food Chemistry 126: 1636-1642. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.046>.

Zhou, P. and J.M. Regenstein. 2005. Effects of alkaline and acid pretreatments on alaska pollock skin gelatin extraction. Journal of Food Science 70: c392-c396. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.tb11435.x.

Šližytė, R., A.K. Carvajal, R. Mozuraityte, M. Aursand and I. Storrø. 2014. Nutritionally rich marine proteins from fresh herring by-products for human consumption. Process Biochemistry 49: 1205-1215. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.012>.

VIII. ANEXOS

8.1 Ficha técnica de la enzima utilizada

Page 1 of 2



Novo-Pro D™

Novo Pro D is used for making animal protein hydrolysates to be applied for flavor and digest products within the pet food industry.

When animal proteins are hydrolyzed the taste and flavor are improved resulting in a better palatability of the final pet food. Novo Pro D provides for basic protein hydrolysate production.

Recommend dosage

0.5-2.0 kg/ton of raw material depending on temperature, pH, reaction time, and raw material.

Reaction parameters

The reaction parameters are important and should be controlled during hydrolysis:

- pH optimum is 7–9
- Temperature optimum is 50–65 °C
- Time is another reaction parameter, and is related to enzyme dosage, thus shorter reaction time requires higher enzyme dosage or vice versa

Process description

Raw material is often poultry by-products as well as porcine and bovine organs, e.g. lungs, hearts and liver.

Grinding of the raw material before transferring the meat to the hydrolysis tank is recommended. This is done to give the enzymes better access to the meat proteins.

Hydrolysis temperature should be 65 °C to maintain a good quality of the product.

Termination of the hydrolysis is by heat treatment. This ensures good microbial quality and enhanced flavor. Various reducing sugars and free amino acids may be added to further enhance flavor development.

Protease inactivation occurs at the same time (85 °C for 15 minutes natural pH or instantly at pH 3.0). Thus no residual activity is present in the final product.

The hydrolysate should be sieved before filled into containers or jerry cans, to avoid any blockage of spray systems when applied.

Examples of dosage/temperature/pH/time relationships			
Dosage g/kg raw material	Temperatur °C	pH	Time hours
2.0	55	6	1
1.0	65	6	1
1.0	55	7	1
0.5	55	8	1
0.5	65	8	0.5
2.0	65	6	0.5

Safety, handling and storage

Safety, handling and storage guidelines are provided with all products.

Novozymes A/S
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd
Denmark

Tel. +45 4446 0000
Fax +45 4446 9999

For more information
and addresses of
international offices,
please see
www.novozymes.com

Laws, regulations, and/or third party rights may prevent customers from importing, using, processing, and/or reselling the products described herein in a given manner. Without separate, written agreement between the customer and Novozymes to such effect, this document does not constitute a representation or warranty of any kind and is subject to change without further notice.

© Novozymes A/S No. 2007-38678-01

8.2 Condiciones de operación del liofilizador

Zirbus technology GmbH

Sublimator 2x3x3/5

Attachment D: Recipe example

No.	Step	mbar	°C	min
1	FT01: Freezing step	/	-10	1
2	FT02: Freezing step	/	-10	60
3	FT03: Freezing step	/	-45	1
4	FT04: Freezing step	/	-45	60
5	FT05: Freezing step	/	0	0
6	FT06: Freezing step	/	0	0
7	FT07: Freezing step	/	0	0
8	FT08: Freezing step	/	0	0
9	FT09: Freezing step	/	0	0
10	FT10: full cooling power	/	0	60
11	FT-Product	/	-45	/
12	D01: Main Drying step	1,000	-25	1
13	D02: Main Drying step	1,000	-25	300
14	D03: Main Drying step	1,000	-10	120
15	D04: Main Drying step	1,000	10	120
16	D05: Main Drying step	1,000	20	120
17	D06: Main Drying step	0,500	25	120
18	D07: Main Drying step	0,500	25	300
19	D08: Main Drying step	0,500	35	300
20	D09: Main Drying step	0,500	35	60
21	D10: Main Drying step	0	0	0
22	PRT increase	0,100	/	5
23	P01: Past Drying step	/	20	1
24	P02: Past Drying step	/	20	300
25	P03: Past Drying step	/	0	0
26	P04: Past Drying step	/	0	0
27	P05: Past Drying step	/	0	0
28	P06: Past Drying step	/	0	0
29	P07: Past Drying step	/	0	0
30	P08: Past Drying step	/	0	0
31	P09: Past Drying step	/	0	0
32	P10: Past Drying step	/	0	0

Maximum speed to cool down

Holding time for -10°C

Sublimator is cooling with maximum power for the set time. Reached temperature is not significant!

All Product sensors must reach this setpoint. It have to be smaller than the last temperature setpoint in the freezing steps.

At this step the freeze dryer use 120 minutes to go from +10°C to +20°C


If you don't want to use a step, you have to put 0 in the time field. The value in the temperature field isn't significant.

This step is to check if the product is dry. The freeze dryer close the flap between chamber and condenser for the written time (5minutes) and check the pressure increase of the chamber. The increase must be smaller than 0,100mbar. If this is ok system go to past drying. If it is not ok system go back to the last active main drying step so you have to choose a small time for this step.



All Program steps working by temperature ramp. It means if you have an temperature of +20°C and you want to reach -20°C slowly you put 300minutes in the time field. Hence -20°C will be reached after 300minutes, not before. And if you want to reach -20°C very fast, you have to put 1minute in the time field. 1minute isn't possible, but the machine is cooling as fast as it can, to reach the -20°C. If you choose same temperature two times, the second one is holding time.

8.3 Procedimiento de limpieza del equipo de MF-UF

 SISTEMA GESTIÓN DE CALIDAD	P-AP-016
	Página 2 de 6
PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA DEL EQUIPO PILOTO DE MF-UF	Emisión N°: 2
	Fecha de emisión: 18/06/13
	Emitido por: M. Soto
	Aprobado por: M. Montero

1. Objetivo

Establecer la forma en la cual se deben llevar a cabo los procedimientos de limpieza después de realizar las pruebas de microfiltración y ultrafiltración tangencial, empleando el equipo piloto en la planta piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA).

2. Alcance


El presente procedimiento debe ser aplicado durante los procedimientos de limpieza antes y después de realizar las pruebas de filtración por membranas empleando el equipo piloto de microfiltración y ultrafiltración tangencial.

3. Responsables

La aplicación del presente procedimiento es responsabilidad del personal de planta piloto del CITA, así como de los asistentes y tesarios de proyectos que involucren el uso del equipo piloto de microfiltración y ultrafiltración tangencial.

La elaboración y revisión del presente procedimiento es responsabilidad de los investigadores involucrados en proyectos en los cuales se utilice el equipo piloto de microfiltración y ultrafiltración tangencial.


La aprobación del presente procedimiento es responsabilidad del Jefe de Planta Piloto.

 SISTEMA GESTIÓN DE CALIDAD	P-AP-016
	Página 3 de 6
PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA DEL EQUIPO PILOTO DE MF-UF	Emisión N°: 2
	Fecha de emisión: 18/06/13
	Emitido por: M. Soto
	Aprobado por: M. Montero


4. Procedimiento de limpieza del equipo piloto de microfiltración (MF) y ultrafiltración (UF)

Cuadro I. Procedimiento de limpieza del equipo piloto de MF-UF: membrana de MF (Membralox®, Inside CÉRAM™).


Sustancia	Tiempo (min)	Presión bomba neumática (psi)	Temperatura (°C)	Procedimiento	Observaciones
-	-	-	-	Terminado el proceso de MF, cierre la válvula de permeado, abra la válvula de retenido y espere a que no salga más fluido. Cierre la válvula de retenido	Recoja el retenido en un recipiente
Agua	10	40	60	Llene el sistema con agua, abra la válvula de reciclo y drene el sistema	Utilice agua suavizada*
Agua	10	40	60	Abra la válvula de permeado y cierre la de reciclo, drene el sistema	Utilice agua suavizada. Verifique: a) pH del agua (± 1 unidad del pH del agua suavizada). b) flujo de agua no esté turbia**
-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la de reciclo abiertas	-
<p>* La temperatura no debe de cambiar repentinamente (choque térmico). El calentamiento o enfriamiento se hará recirculando el líquido por la membrana. El gradiente de temperatura debe ser de 10 °C por minuto.</p> <p>** Si el agua se ve turbia o el pH está fuera de los límites (± 1 unidad del pH del agua utilizada), repetir el enjuague nuevamente con agua durante otros 5 min. Verifique el pH y la turbidez. Si el equipo no se ha enjuagado correctamente repita lo anterior las veces que sean necesarias.</p>					
Disolución básica (Hipoclorito de sodio NaOCl 500 ppm; Hidróxido de sodio NaOH 1% m/m)	20	40	60	Llene el sistema, coloque la manguera de reciclo en la marmita y recircule por el tiempo establecido	Se utilizan alrededor de 18L de agua (un balde grande lleno) Utilice 182,0 g de NaOH y 76 mL de cloro 12% en 18 L*

 SISTEMA GESTIÓN DE CALIDAD	P-AP-016
	Página 4 de 6
PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA DEL EQUIPO PILOTO DE MF-UF	Emisión N°: 2
	Fecha de emisión: 18/06/13
	Emitido por: M. Soto
	Aprobado por: M. Montero

-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la de reciclo abiertas	Deseche la disolución en el balde de neutralización
Disolución básica (Hidróxido de sodio NaOH 2% m/m)	30	40	60	Llene el sistema, coloque la manguera de reciclo y la de permeado en la marmita y recircule por el tiempo establecido	Se utilizan alrededor de 18L de agua (un balde grande lleno) Utilice 364,0 g de NaOH en 18 L*
Disolución básica (Hidróxido de sodio NaOH 2% m/m)	30	40	60	Abra lentamente la válvula de permeado y cierre la válvula del reciclo, recircule por 30 min	Utilice la solución anterior
-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la de reciclo abiertas	Deseche la disolución en el balde de neutralización
Agua	10	40	ambiente	Llene el sistema con agua, abra la válvula de reciclo y drene el sistema	Utilice agua suavizada*
Agua	10	40	ambiente	Abra la válvula de permeado y cierre la de reciclo, drene el sistema	Utilice agua suavizada. Verifique: a) pH del agua (± 1 unidad del pH del agua suavizada). b) flujo de agua no esté turbia**
-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la de reciclo abiertas	-
<p>* La temperatura no debe de cambiar repentinamente (choque térmico). El calentamiento o enfriamiento se hará recirculando el líquido por la membrana. El gradiente de temperatura debe ser de 10 °C por minuto. ** Si el agua se ve turbia o el pH está fuera de los límites (± 1 unidad del pH del agua utilizada), repetir el enjuague nuevamente con agua durante otros 5 min. Verifique el pH y la turbidez. Si el equipo no se ha enjuagado correctamente repita lo anterior las veces que sean necesarias.</p>					
Disolución ácida (Ácido nítrico HNO ₃ 1% m/m)	15	40	60	Llene el sistema, coloque la manguera de reciclo y la de permeado en la marmita y recircule por el tiempo	Se utilizan alrededor de 18L de agua (un balde grande lleno) Utilice 261,0 g de HNO ₃ 70% en 18 L*


 SISTEMA GESTIÓN DE CALIDAD	P-AP-016
	Página 5 de 6
PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA DEL EQUIPO PILOTO DE MF-UF	Emisión N°: 2
	Fecha de emisión: 18/06/13
	Emitido por: M. Soto
	Aprobado por: M. Montero

				establecido	
Disolución ácida (Ácido nítrico HNO ₃ 1% m/m)	15	40	60	Abra lentamente la válvula de permeado y cierre la válvula del reciclo, recircule por 15 min	Utilice la solución anterior
-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la de reciclo abiertas	Deseche la disolución en el balde de neutralización
Agua	10	40	ambiente	Llene el sistema con agua, abra la válvula de reciclo y drene el sistema	Utilice agua suavizada*
Agua	10	40	ambiente	Abra la válvula de permeado y cierre la de reciclo, drene el sistema	Utilice agua suavizada. Verifique: a) pH del agua (± 1 unidad del pH del agua suavizada). b) flujo de agua no esté turbia**
-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la de reciclo abiertas	-
<p>* La temperatura no debe de cambiar repentinamente (choque térmico). El calentamiento o enfriamiento se hará recirculando el líquido por la membrana. El gradiente de temperatura debe ser de 10 °C por minuto.</p> <p>** Si el agua se ve turbia o el pH está fuera de los límites (± 1 unidad del pH del agua utilizada), repetir el enjuague nuevamente con agua durante otros 5 min. Verifique el pH y la turbidez. Si el equipo no se ha enjuagado correctamente repita lo anterior las veces que sean necesarias.</p>					
Agua	-	Presión de proceso	25	Realice la medición de la permeabilidad de la membrana. Si está en un 20% por debajo de la permeabilidad original del equipo realice nuevamente el procedimiento de limpieza ya descrito	Utilice agua suavizada
Disolución desinfectante (Hipoclorito de sodio NaOCl 200ppm)	10	40	ambiente	Llene el sistema, coloque la manguera del reciclo en la marmita y recircule por el tiempo establecido	Se utilizan alrededor de 18L de agua (un balde grande lleno) Utilice 90 mL de cloro 12% en 18 L.


 SISTEMA GESTIÓN DE CALIDAD	P-AP-016
	Página 6 de 6
PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA DEL EQUIPO PILOTO DE MF-UF	Emisión N°: 2
	Fecha de emisión: 18/06/13
	Emitido por: M. Soto
	Aprobado por: M. Montero

Cuadro II. Procedimiento de limpieza del equipo piloto de MF-UF: membrana de UF (Membralox®, Inside CERAM™).

Sustancia	Tiempo (min)	Presión bomba neumática (psi)	Temperatura (°C)	Procedimiento	Observaciones
-	-	-	-	Terminado el proceso de UF, cierre la válvula de permeado, abra la válvula de retenido y espere a que no salga más fluido. Cierre la válvula de retenido	Recoja el retenido en un recipiente
Agua	10	40	60	Llene el sistema con agua, abra la válvula de reciclo y drene el sistema	Utilice agua suavizada*
Agua	10	40	60	Abra la válvula de permeado y cierre la de reciclo, drene el sistema	Utilice agua suavizada. Verifique: a) pH del agua (± 1 unidad del pH del agua suavizada). b) flujo de agua no esté turbia**
-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la de reciclo abiertas	-
<p>* La temperatura no debe de cambiar repentinamente (choque térmico). El calentamiento o enfriamiento se hará recirculando el líquido por la membrana. El gradiente de temperatura debe ser de 10 °C por minuto. ** Si el agua se ve turbia o el pH está fuera de los límites (± 1 unidad del pH del agua utilizada), repetir el enjuague nuevamente con agua durante otros 5 min. Verifique el pH y la turbidez. Si el equipo no se ha enjuagado correctamente repita lo anterior las veces que sean necesarias.</p>					
Disolución básica (Hidróxido de sodio NaOH 2% m/m)	30	40	70	Llene el sistema, coloque la manguera de reciclo y la de permeado en la marmita y recircule por el tiempo establecido	Se utilizan alrededor de 18L de agua (un balde grande lleno) Utilice 364,0 g de NaOH en 18 L*
Disolución básica (Hidróxido de sodio NaOH 2% m/m)	30	40	70	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la de reciclo abiertas	Utilice la solución anterior
-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la	Deseche la disolución en el balde de

 SISTEMA GESTIÓN DE CALIDAD	P-AP-016
	Página 7 de 6
PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA DEL EQUIPO PILOTO DE MF-UF	Emisión N°: 2
	Fecha de emisión: 18/06/13
	Emitido por: M. Soto
	Aprobado por: M. Montero

				bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la de reciclo abiertas	neutralización
Agua	10	40	ambiente	Llene el sistema con agua, abra la válvula de reciclo y drene el sistema	Utilice agua suavizada*
Agua	10	40	ambiente	Abra la válvula de permeado y cierre la de reciclo, drene el sistema	Utilice agua suavizada. Verifique: a) pH del agua (± 1 unidad del pH del agua suavizada). b) flujo de agua no esté turbia**
-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la de reciclo abiertas	-
<p>* La temperatura no debe de cambiar repentinamente (choque térmico). El calentamiento o enfriamiento se hará recirculando el líquido por la membrana. El gradiente de temperatura debe ser de 10 °C por minuto.</p> <p>** Si el agua se ve turbia o el pH está fuera de los límites (± 1 unidad del pH del agua utilizada), repetir el enjuague nuevamente con agua durante otros 5 min. Verifique el pH y la turbidez. Si el equipo no se ha enjuagado correctamente repita lo anterior las veces que sean necesarias.</p>					
Lavado ácido para membranas <i>Insíde CÉRAM™</i>					
Disolución ácida (Ácido fosfórico H ₃ PO ₄ 0,075% m/m)	15	40	50	Llene el sistema, coloque la manguera de reciclo y la de permeado en la marmita y recircule por el tiempo establecido	Se utilizan alrededor de 18L de agua (un balde grande lleno) Utilice 18,0 g de H ₃ PO ₄ 75% en 18 L*
Disolución ácida (Ácido fosfórico H ₃ PO ₄ 0,075% m/m)	15	40	50	Abra lentamente la válvula de permeado y cierre la válvula del reciclo, recircule por 15 min	Utilice la solución anterior
Lavado ácido para membranas <i>Membralox®</i>					
Disolución ácida (Ácido nítrico HNO ₃ 1% m/m)	15	40	60	Llene el sistema, coloque la manguera de reciclo y la de permeado en la marmita y recircule por el tiempo establecido	Se utilizan alrededor de 18L de agua (un balde grande lleno) Utilice 261,0 g de HNO ₃ 70% en 18 L*

 SISTEMA GESTIÓN DE CALIDAD	P-AP-016
	Página 8 de 6
PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA DEL EQUIPO PILOTO DE MF-UF	Emisión N°: 2
	Fecha de emisión: 18/06/13
	Emitido por: M. Soto
	Aprobado por: M. Montero

Disolución ácida (Ácido nítrico HNO ₃ 1% m/m)	15	40	60	Abra lentamente la válvula de permeado y cierre la válvula del reciclo, recircule por 15 min	Utilice la solución anterior
-	-	-	-	Apague la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drene el sistema con la válvula del retenido y la de reciclo abiertas	Deseche la disolución en el balde de neutralización
Agua	10	40	ambiente	Llene el sistema con agua, abra la válvula de reciclo y drene el sistema	Utilice agua suavizada*
Agua	10	40	ambiente	Abra la válvula de permeado y cierre la de reciclo, drene el sistema	Utilice agua suavizada. Verifique: a) pH del agua (± 1 unidad del pH del agua suavizada). b) flujo de agua no esté turbia**
-	-	-	-	Apagar la bomba centrífuga y luego la bomba neumática. Drenar el sistema con la válvula del retenido y la del reciclo abiertas	-
<p>* La temperatura no debe de cambiar repentinamente (choque térmico). El calentamiento o enfriamiento se hará recirculando el líquido por la membrana. El gradiente de temperatura debe ser de 10 °C por minuto.</p> <p>** Si el agua se ve turbia o el pH está fuera de los límites (± 1 unidad del pH del agua utilizada), repetir el enjuague nuevamente con agua durante otros 5 min. Verifique el pH y la turbidez. Si el equipo no se ha enjuagado correctamente repita lo anterior las veces que sean necesarias.</p>					
Agua	-	Presión de proceso	25	Realice la medición de la permeabilidad de la membrana. Si esta en un 20% por debajo de la permeabilidad original del equipo realice nuevamente el procedimiento de limpieza ya descrito	Utilice agua suavizada
Disolución desinfectante (Hipoclorito de sodio NaOCl 200 ppm)	10	40	ambiente	Llene el sistema, coloque la manguera del reciclo en la marmita y recircule por el tiempo establecido.	Se utilizan alrededor de 18L de agua (un balde grande lleno) Utilice 30 mL de cloro 12% en 18 L.