



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO EN ALIMENTOS**

TEMA:

OBTENCIÓN DE UN HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE *Aequidens rivulatus*
(VIEJA AZUL), UTILIZANDO ENZIMAS PROTEOLÍTICAS, MACHALA, 2014

Aspirante:

Giovanny Patricio Ortega Sánchez

TUTOR:

Ing. Humberto Ayala Armijos, Mg. Sc.

MACHALA

EL ORO

ECUADOR

2015

CERTIFICACIÓN

Este trabajo de investigación titulado, **“OBTENCIÓN DE UN HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE *Aequidens rivulatus* (VIEJA AZUL), UTILIZANDO ENZIMAS PROTEOLÍTICAS, MACHALA, 2014”**, realizado por el Egresado Giovanny Patricio Ortega Sánchez, ha sido prolijamente dirigido y revisado, por lo tanto autorizo su presentación previa la obtención del título de ingeniero en alimentos.

.....
Ing. Humberto Ayala Armijos, Mg. Sc.

TUTOR

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTORÍA

Yo, **Giovanny Patricio Ortega Sánchez**, con cedula de identidad 070535078-3, egresado de la escuela de Ingeniería en Alimentos, de la Facultad de Ciencia Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala, responsable de la presente Tesis Técnica Científica titulada **“OBTENCIÓN DE UN HIDROLIZADO DE PROTEÍNA DE *Aequidens rivulatus* (VIEJA AZUL), UTILIZANDO ENZIMAS PROTEOLÍTICAS, MACHALA, 2014 ”**, certifico que la responsabilidad de la investigación, resultados y conclusiones del presente trabajo pertenecen exclusivamente a mi autoría, una vez que ha sido aprobado por mi tribunal de sustentación de tesis autorizando su presentación.

Deslindo a la Universidad Técnica de Machala de cualquier delito de plagio y cedo mis derechos de autor a la Universidad Técnica de Machala para que ella proceda a darle el uso que crea conveniente.

.....

Giovanny Patricio Ortega Sánchez

070535078-3

EL AUTOR

RESPONSABILIDAD

El presente trabajo de investigación: resultados, conclusiones y recomendaciones son de responsabilidad única y exclusiva del autor.

Giovanny Patricio Ortega Sánchez

C.I. 0704745983-3

DEDICATORIA

A Dios por haberme dado sabiduría y valor para la culminación de mi carrera profesional con éxito. A mis padres, tíos y hermanos por sus sabios consejos que me supieron dar y por brindarme su apoyo incondicional, para así poder culminar el primer peldaño de mi vida profesional.

Giovanny Patricio Ortega Sánchez

AGRADECIMIENTO

A dios, mi creador, quien me ha dado todo en esta vida y por quien hoy vivo.

A mi padre y madre, que con su amor, apoyo y su ejemplo de esfuerzo y sacrificio me ha permitido culminar el primer peldaño de mi vida profesional

A Mariana, mi hermana, que con sus consejos supo darme aliento para finalizar este estudio.

A mis amigos Yingo, y Cristopher por su apoyo incondicional en la culminación de este trabajo de titulación.

Al Ing. Humberto Ayala Armijos por brindarme sus conocimientos profesionales, su apoyo incondicional y sus consejos para la culminación mi trabajo de titulación.

A Diana, Katty, Cristopher, Johnny, Silvia por compartir su sincera amistad durante 5 años de vida universitaria.

El autor

RESUMEN

En esta investigación se obtuvo un hidrolizado de proteína de *aequidens rivulatus* (vieja azul), utilizando enzimas proteolíticas (GRANOZYME ACC), en la que se aplicó un diseño experimental de 6 tratamientos con 12 réplicas donde los tratamientos A (1 ml), C (2 ml) y E (3 ml) realizados a una temperatura de 28 ° C durante 24 horas, no se hidrolizaron, ya que la enzima no catalizo al sustrato a esta temperatura. Mientras que los tratamientos restantes B (1 ml), D (2 ml) y F (3 ml) realizados a una temperatura de 55 ° C durante 24 horas si se hidrolizaron alcanzando el tratamiento D mayor concentración significativa con un 90.3 % seguido del F con un 88,9 % y tan solo 85,5 % alcanzo el tratamiento B con una viscosidad cinemática de 0,15 mm² /s. También se obtuvo un 24 % de proteína, con un 73 % humedad, con el 2 % de grasa y el 1 % de ceniza según los análisis fisicoquímicos realizados. Según la caracterización realizada de la materia prima el porcentaje proteico del pescado de vieja azul alcanzó un 20 %, con el 76 % humedad, el 3 % de grasa y el 2 % de ceniza esto se lo realizó para facilitar el hidrolizado mediante la aplicación de enzimas proteasas su comparación de la materia prima y el hidrolizado proteíca obtenida. También se determinó los análisis microbiológicos para saber si existe carga microbiana en este caso si existe pero no supera los límites máximos permitidos según el boletín Real del Estado Español (B.O.E)

SUMMARY

In this research, It was obtained a hydrolyzate of protein of rivulatus aequidens (old blue) using enzymes proteolytic (GRANOZYME ACC), in which it was applied a design experimental of 6 treatments with 12 replicates where the 3 first treatments A (1 ml), C (2 ml) and E (3 ml) made to a temperature of 28 ° C for 24 hours not was hydrolysates already that the enzyme not catalyzed to the substrate at this temperature, while that the 3 treatments remaining B (1 ml), D (2 ml) and F (3 ml) made to a temperature of 55 ° C for 24 hours yes are hydrolysates reaching the treatment D biggest concentration significativa with a 90,3 % followed by F with a 88.9 % and so alone the 85,5 % I reach the treatments B with a viscosity kinematic of 0,15 mm/s. also it was obtained a 24 % of protein, with a 73 % de humidity, with the 2 % of fat and the 1 % of ash according to analysis physicochemical performed according to the characterization made of the raw material fish protein percentage of old blue reached a 20 %, with the 76 % of humidity, the 3 % of fat and the 2 % of ash. This are to made to facilitate through the hydrolyzed application by enzymes protease, Comparison of the raw material and the hydrolyzate proteic obtained. It was also determined the analysis microbiological to know yes there load microbial in this case yes there but no exceeds the maximum allowable limits according to the bulletin royal the state Spanish (BOE)

ÍNDICE

CONTENIDO

CERTIFICACIÓN	ii
CESIÓN DE DERECHOS DE AUTORÍA	iii
RESPONSABILIDAD.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
RESUMEN	vii
SUMMARY.....	viii
ÍNDICE.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
INTRODUCCIÓN	1
PROBLEMA.....	3
JUSTIFICACIÓN	4
OBJETIVOS	5
HIPÓTESIS	5
1. MARCO TEÓRICO.....	6
1.1. VIEJA AZUL (Aequidens rivulatus).....	6
1.1.1. Características	6
1.3. HIDROLISIS	11
1.3.1. Hidrolisis de una sal.....	11
1.3.2. Hidrolisis enzimática	12

1.3.3.	Etapas de la hidrólisis enzimática.....	12
1.3.4.	Condiciones de la hidrólisis enzimática.....	13
1.3.5.	Característica de los hidrolizados enzimáticos	13
1.4.	HIDROLISIS DE PROTEÍNA	13
1.4.1.	Importancia de los hidrolizados de proteína	14
1.4.2.	Ventajas de la hidrolisis de proteína.	14
1.4.3.	El sustrato en los hidrolizados proteicos.....	15
1.4.4.	Propiedades funcionales de un hidrolizado de proteína.....	15
1.4.5.	Condiciones de la hidrólisis	16
1.5.	ENZIMAS.....	17
1.5.1.	Clasificación de las enzimas.	17
1.5.2.	Factores que afectan la actividad enzimática.....	18
1.6.	PROTEASAS.....	19
1.6.1.	Mecanismo de acción.....	20
2.	MÉTODOS Y TÉCNICAS	21
2.1.	LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO.....	21
2.1.1.	Caracterización de la zona de obtención de la materia prima.....	21
2.2.	MUESTRA	23
2.3.	MÉTODO	23
2.3.1.	Tipo de investigación.....	23
2.3.2.	Diseño de la investigación	24
2.3.3.	Diagrama de flujo del hidrolizado de proteína de pescado.....	25
2.3.4.	Descripción del diagrama de flujo	26
2.3.4.3.	Eviscerado	26
2.3.4.5.	Hidrolizado.....	26
2.3.4.6.	Inactivación	26

2.3.4.8.	Almacenado.....	26
2.4.	MÉTODOS ANALÍTICOS	27
2.4.1.	Método para la determinación del pH.....	27
2.4.2.	Método para la determinación de la viscosidad.....	27
2.4.3.	Método para la determinación de Proteína	27
2.4.4.	Método para la determinación de ceniza	28
2.4.5.	Método para la determinación de grasas.....	29
2.4.6.	Método para la determinación de la humedad	30
2.4.7.	Método para la determinación de aerobios mesófilos y coliformes	30
2.5.	VARIABLES.....	31
2.5.1.	Variable independiente	31
2.5.2.	Variable dependiente	31
2.6.	RECURSOS A EMPLEAR	31
2.6.2.	Químicos.....	31
2.6.3.	Físicos	32
3.	ANÁLISIS Y RESULTADOS	33
3.1.	CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE LA MATERIA PRIMA (VIEJA AZUL)	33
3.2.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMAS PARA ALCANZAR UN PORCENTAJE DE HIDROLIZADO CERCANO AL 100 %.....	34
3.3.	DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE INTERVIENE EN LA HIDROLISIS ENZIMÁTICAS (pH, NITRÓGENO TOTAL, SOLIDOS TOTALES DISUELTOS).	35
3.3.1.	Determinación del pH durante el tiempo de hidrolizado.....	35
3.3.2.	Determinación del porcentaje de proteína durante el tiempo de hidrolisis	

3.4. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS EN EL HIDROLIZADO	37
3.5. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICA MICROBIOLÓGICAS EN EL HIDROLIZADO.....	38
3.6. ANÁLISIS DE VARIANZA	39
3.6.1. Prueba de Tukey	39
3.6.2. Prueba de Hipótesis	40
4. CONCLUSIONES	42
4.1. RECOMENDACIONES.....	43
5. BIBLIOGRAFIA	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras 1: <i>Aequidens rivulatus</i> (vieja azul).....	8
Figuras 2: Mecanismo catalítico de una proteína	12
Figuras 3: Actividad de la enzima dependiente de pH	16
Figuras 4: Actividad de la enzima depende de la temperatura (°C).....	16
Figuras 5: Coordenadas de la universidad Técnica de Machala.....	21
Figuras 6: Humedal “La Tembladera”	22
Figuras 7: Fotografía satelital de la laguna “La Tembladera”.....	22
Figuras 8: Filete de pescado	23
Figuras 9: Diagrama de flujo del hidrolizado.....	25
Figuras 10: Composición fisicoquímica de la carne del pescado vieja azul	33
Figuras 11: Determinación de la concentración de enzimas	34
Figuras 12: Determinación del pH durante el tiempo de hidrolizado	35
Figuras 13: Porcentaje de proteína hidrolizada en el tiempo de hidrolisis.....	36
Figuras 14: Características fisicoquímicas del hidrolizado.....	37
Figuras 15: Carga microbiológica	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Ubicación taxonómica de la especie.....	7
Tabla 2: Composición química del pescado	11
Tabla 3: Diseño factorial del experimento.....	24
Tabla 4: Análisis ANOVA del experimento.....	39
Tabla 5: Prueba de Tukey	40

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Obtención del hidrolizado	49
Anexo 2: Determinación de humedad	51
Anexo 3: Determinación de ceniza	52
Anexo 4: <i>Determinación de proteínas</i>	53
Anexo 5: Determinación de grasa	53
Anexo 6: Determinación de pH.....	54
Anexo 7: Viscosidad	55
Anexo 8: Análisis microbiológicos	55

INTRODUCCIÓN

En la provincia de El Oro se encuentra un conjunto de lagunas y ríos de agua dulce que cumplen funciones ecológicas de importancia para el mantenimiento de la biodiversidad y de la calidad del agua, estos cuerpos de agua han venido sirviendo desde hace muchos años como fuente de alimento, abastecimiento de agua dulce, e ingresos económicos a través del desarrollo de actividades productivas como la pesca y la agricultura. El humedal de mayor importancia es la Tembladera en la Provincia del Oro el cual se encuentra ubicado en el cantón Santa Rosa. Este humedal es parte de un conjunto de lagunas ubicadas al sur oeste del Cantón Santa Rosa, es el de mayor extensión y utilidad para los pobladores del sector. El Municipio de Santa Rosa ha mostrado interés en la protección de este sitio, inclusive existen algunos proyectos planteados en el Plan de Desarrollo Estratégico Cantonal para que el humedal tenga una designación como área protegida y para la implementación de prácticas productivas sustentables. (PMRC, 2006)

La hidrólisis enzimática de proteínas hasta péptidas y aminoácidos, por la acción de enzima proteolítica se obtuvo un hidrolizado con una composición final que los hace aplicables en la tecnología alimentaria por sus propiedades nutricionales o funcionales. Además del proceso de hidrólisis, existen una serie de factores que necesitan considerarse, como la naturaleza y calidad de la materia prima, la enzima escogida y las condiciones de reacción. Usando como sustrato de proteína filetes de *Aequidens rivulatus* (vieja azul) y evaluando sobre éstos diferentes concentraciones de enzimas.

Una de las aplicaciones más importantes de los hidrolizados de proteínas es su utilización como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas con destino a la alimentación infantil o de adultos enfermos. Estas dietas entéricas se diseñan para ser absorbidas en el intestino sin una digestión previa en el estómago y son esenciales en el tratamiento de pacientes con desórdenes estomacales o problemas de la mucosa intestinal, así como en lactantes con síndromes de malabsorción o malnutrición, con cuadros alérgicos en la mayoría de los casos. (Benitez, 2008)

Las características que deben cumplir estos hidrolizados de proteínas para formar parte de una dieta enteral son: no producir desequilibrios osmóticos ni alergias, presentar un

alto valor nutritivo, no muy inferior al de la proteína de partida y tener un sabor agradable.

Los métodos de obtención de estos hidrolizados no son complicados y se pueden realizar con equipos sencillos. En cualquier caso, los métodos de hidrólisis permiten el aprovechamiento de pescados baratos y de desperdicios de pescado y resultan de gran utilidad en áreas en las que se concentran grandes cantidades de pescado cuyo transporte sería costoso. (Guadix, 2000)

En la presente investigación se obtuvo como objetivo la obtención de un hidrolizado de proteína de *Aequidens rivulatus* (vieja azul), utilizando enzimas proteolíticas. Para lo cual se buscó aplicar un proceso de hidrólisis enzimática en la que se analizara las características fisicoquímicas, microbiológicas de la materia prima y del hidrolizado, y a su vez se obtendrá la concentración de enzima óptimas para porcentaje de hidrolizado cercano al 100 % bajo las condiciones de pH y temperatura adecuada.

PROBLEMA

La producción de recursos ictiológicos como es el cultivo de vieja azul para la elaboración de derivados cárnicos es un proceso que se ve afectado por su poca industrialización y comercialización debido a que es un producto muy perecedero, su tiempo de vida útil fluctúa entre las 10 - 12 horas a temperaturas de refrigeración (4°C), y en congelación puede durar hasta 6 días, convirtiéndolo en un alimento de riesgo tipo A según el Registro Oficial N°260 del Ministerio de Salud Pública.

Las incorrectas prácticas de procesamiento al no cumplirse con las Buenas Prácticas de Manufactura en la distribución, preparación y almacenamiento de los productos alimenticios como los pescados y mariscos están obligando a las autoridades de salud a asumir posiciones más rigurosas en cuanto al control de la calidad e inocuidad de los alimentos. La mayor severidad de las normas y el aumento de las acciones de inspección indican que la situación de los productos alimenticios, tanto en los mercados nacionales como en los internacionales, debe ser objeto de esfuerzos sostenidos para lograr que todos los países cuenten con sistemas efectivos de control de calidad e inocuidad. Es preciso que se establezcan acuerdos de reconocimiento mutuo y de equivalencia en beneficio de un intercambio comercial más fácil de productos cuyo consumo dé mayores garantías de seguridad.

JUSTIFICACIÓN

En esta investigación tuvo como finalidad el aprovechamiento de *Aequidens rivulatus* (vieja azul), utilizando métodos biotecnológicos para realizar el hidrolizado mediante la utilización de la enzima proteolíticas de la marca comercial GRANOZYME ACC el mismo que será a beneficio de los habitantes de la comuna San José los que se dedican a la siembra de esta especie en la laguna la Tembladera y así dar un valor agregado y mejorando la vida útil del pescado vieja azul. Ya que en esta provincia del Oro se encuentra un conjunto de lagunas y ríos de agua dulce que cumplen funciones ecológicas de importancia para el mantenimiento de la biodiversidad y de la calidad del agua que han abastecido de agua dulce, e ingresos económicos a través del desarrollo de actividades productivas como pesca de vieja azul.

Esta investigación aportara con conocimientos científicos y técnicos, ya que se realizó un hidrolizado proteico para el aprovechamiento masivo de la vieja azul a fin de lograr insertar este producto al mercado de manera competitiva en la industria cárnica o como suplemento nutricional para ancianos y niños, teniendo mayor productividad a menor costo, preservando el recurso natural y el ambiente que los rodea. Las personas que se dedican a esta actividad pesquera se ven respaldadas por la calidad de su producto, garantizando una producción sostenible y sustentable.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Obtener un hidrolizado de proteína de *Aequidens rivulatus* (vieja azul), utilizando enzimas proteolíticas.

Objetivo específicos

- Realizar la caracterización física químicas de la materia prima.
- Determinar las concentraciones de enzimas óptimas para alcanzar un porcentaje de hidrolizado cercano al 100 % bajo las condiciones de pH y temperatura adecuada.
- Analizar las características físicos químicas y microbiológicas del hidrolizado obtenido.

HIPÓTESIS

El rendimiento del hidrolizado de proteína de carne de *Aequidens rivulatus* (vieja azul) es dependiente de la concentración enzimática.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. VIEJA AZUL (*Aequidens rivulatus*)

Pez de la familia de Cichlidae del género *Aequidens rivulatus* nativo de la cuenca del Pacífico, abarcando su distribución desde Ecuador hasta Perú. Esta especie se distribuye desde el río Esmeralda, en Ecuador, hasta el río Pisco en Perú. Las variedades “goldsaum” se encuentra desde el río Esmeralda y todo el sistema del río Guayas en Ecuador. En Perú se encuentra desde los ríos Tumbes, Zarumilla hasta el río Piura. La variedad “silversaum” se distribuye sólo en Perú, desde el río Piura hasta el río Pisco, con pequeñas variaciones entre la variedad norteña, y su población se extiende desde Perú a Panamá. Esta especie de *aequidens rivulatus*, además de ser de gran importancia ornamental también es fuente de alimento y trabajo para las poblaciones carentes de recursos económicos, Además, puede convertirse en una especie sustituyente de la manipulada tilapia que ha entrado en controversias desde el punto de vista ecológico. (Mendoza, 2004).

1.1.1. Características

La especie de *aequidens rivulatus* es de gran tamaño. Los machos pueden alcanzar los 30 cm y las hembras suelen quedarse en los 20 cm. Posee un cuerpo alto, comprimido lateralmente y posee de cuatro a cinco manchas. Tanto los machos como las hembras tienen en la zona del mentón y la mejilla múltiples líneas de color azul eléctrico y una mancha negra a la mitad del costado. Los machos adultos desarrollan con el tiempo una joroba. La hembra es de un color verde oliva sin los reflejos metálicos del macho y son más atractivos que las hembras exhibiendo un color base verde blanco brillante. El macho busca juntos a la hembra un sustrato apropiado para colocar los huevos. La hembra incentiva al macho a cuidar el sustrato antes del desove y para que el desove se lleve a cabo requiere una temperatura de 26 ° C, llegando a alcanzar de 100 a 800 huevos, siendo los huevos redondos y de color blanco al provenir el desove, el macho realiza temblores enérgicos, posteriormente fertiliza los huevos colocados en la piedra por la hembra. En esta etapa el macho no se acerca a los huevos, sólo cuida el territorio. La hembra cuida a los huevos todo el día y los oxigena agitando las aletas. A las 48 horas de fertilizados los huevos se forma el corazón y comienza a latir en forma lenta y a las 78 horas se forma columna vertebral. A las 120 horas eclosiona el huevo y sale la larva.

La hembra transporta las larvas a un refugio seguro, a partir de este momento comienzan las larvas a absorber el saco vitelino. A las 196 horas las larvas nadan libremente y buscan alimento permaneciendo aún al cuidado de la hembra que mantiene cuidándolos de depredadores en la boca hasta que alcancen el suficiente tamaño para que ya no sean presa fácil. (Mendoza, 2004)

1.1.2. Taxonomía

Tabla 1: Ubicación taxonómica de la especie

Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Superclase	Pisces
Clase	Osteichthyes
Superorden	Acanthoptergii
Orden	Perciformes
Suborden	Percoidei
Familia	Cichlidae
Subfamilia	Cichlasomatinae
Género	Aequidens Eigenmann
Especie	Aequidens rivulatus
Nombre común	Mojarra o vieja azul

Fuente: (Mendoza, 2004)

1.1.3. La especie *Aequidens rivulatus* (vieja azul)

Se encuentra en la provincia del Oro en el Humedal la Tembladera tiene un alto estado de vulnerabilidad debido a la introducción de la tilapia a este ecosistema, por lo que amerita atender este problema a través de un mecanismo que genere la conservación de esta especie. Como se muestra en la figura 1

Figuras 1: *Aequidens rivulatus* (vieja azul)



Fuente: (Cruz, 2014)

Como la vieja es un pez cada vez más escaso en los ríos de agua dulce de la provincia de El Oro por la introducción de especies como la tilapia, se percibe un potencial significativo de ocupar un nicho del mercado con la producción de un pescado de alta calidad nutricional y rico sabor. Los filetes frescos son las masas musculares de pescado (Vieja Azul) de la misma especie, aptas para el consumo humano; de tamaño y forma irregulares que se separan del cuerpo del pescado mediante cortes netos, paralelos a la columna vertebral, así como los trozos en que se cortan dichas lonjas para facilitar el envasado, elaborados en conformidad con las definiciones contenidas en la Normativa Técnica Ecuatoriana INEN 0183 (INEN, 2012).

1.2. VALOR NUTRITIVO DEL PESCADO

Desde el punto de vista de la alimentación humana, la importancia del pescado radica en su composición química, es una fuente de proteínas de origen animal, vitaminas y compuestos orgánicos tan importantes como otras carnes frescas de mamíferos y aves. Las proteínas del pescado se digieren fácilmente y su elevado valor se debe al tipo y relación de aminoácidos que contienen especialmente los esenciales. El requerimiento diario del hombre se puede estimar en un 1 gr. por cada Kg. de peso corporal una ración de 200 gramos de pescado puede cubrir satisfactoriamente la necesidades del ser humano en la alimentación diaria.

Los aminoácidos esenciales pueden ser: Treonina, valina, leucina, isoleucina y lisina, y además proporciona en cantidades suficientes metionina, fenilalanina y triptófano. En cuanto a su riqueza en vitaminas tenemos que los pescados son más ricos en vitamina A y D que el resto de alimentos y su contenido de vitamina B se aproxima a la de las carnes rojas. La confluencia de tres factores: el ser fácilmente digerible, ser una fuente importante de aminoácidos esenciales y tener en cuenta su contenido abundante de vitaminas y sales minerales, hace del pescado un excelente alimento para el hombre. El pescado como alimento cumple también con todos los requisitos que en la alimentación se necesitan a parte de sus componentes, para constituir la dieta mínima, aspecto, color, digestibilidad y asimilada. (Peña, 2010)

1.2.1.1. Composición química general del pescado

La composición química de los pescados varía considerablemente entre las diferentes especies y también entre individuos de una misma especie, dependiendo de la edad, sexo, medio ambiente y estación del año. Los principales componentes nutricionales son:

1.2.1.2. Agua

El contenido de agua de la carne fresca depende principalmente de su contenido en grasa, existiendo por lo general una relación inversa entre estos componentes.

1.2.1.3. Grasas

El contenido de grasas experimenta oscilaciones tanto que obliga distinguir principalmente entre pescado magros (merluza, lenguado, tollo, corvina, entre otros) y pescados grasos (lisa, jurel, sierra, bonito, caballa). Los peces magros acumulan la grasa en el hígado (aceite de hígado de bacalao). Predominan los ácidos grasos polinsaturados, destacando los omega 3 por sus propiedades antiagregantes, vasodilatadoras y reductoras de los niveles sanguíneos de triglicéridos.

1.2.1.4. La proteína

El contenido proteico de la mayoría de las especies de pescado es relativamente constante, oscila entre 15-20%. Las proteínas del pescado son de un valor nutricional similar al de las carnes de cerdo, ternera, cordero, lácteos, con un contenido y una proporción de aminoácidos esenciales muy parecidos.

Las proteínas del músculo del pescado se pueden dividir en tres grupos:

Proteínas estructurales. Que constituyen el 70 al 80 % del contenido total de proteínas. Las proteínas sarcoplásmicas, que son solubles en soluciones salinas neutras de baja fuerza iónica. Esta fracción constituye el 25 al 30 % del total de proteínas.

Proteínas del tejido conectivo. Que constituyen aproximadamente el 3 % del total de las proteínas en teleósteos y cerca del 10 % en elasmobranquios. Las proteínas estructurales conforman el aparato contráctil responsable de los movimientos musculares. La estructura conformacional de las proteínas de los pescados es fácilmente modificada mediante cambios en el ambiente físico. Tratamientos con altas concentraciones salinas o calor pueden ocasionar la desnaturalización, causando cambios irreversibles en la estructura nativa de la proteína.

Cuando las proteínas son desnaturalizadas bajo condiciones controladas. Sus propiedades pueden ser utilizadas con propósitos tecnológicos. Las proteínas forman un gel muy resistente cuando se añade sal y estabilizadores a una preparación de proteínas musculares, que posteriormente se somete a un proceso de calentamiento y enfriamiento controlado. Cuando los orgánulos se rompen, ocurren cambios en la composición de la fracción de proteínas sarcoplasmáticas. Este hecho fue sugerido como método para diferenciar pescado fresco de pescado congelado, asumiendo que los orgánulos estaban intactos hasta la congelación. Sin embargo se estableció que estos métodos deben ser empleados con gran precaución, dado que algunas enzimas son liberadas de los orgánulos incluso durante el almacenamiento del pescado en hielo. (Peña, 2010)

1.2.1.5. Vitaminas

Los peces contienen una cantidad considerable de vitaminas, siéndolas más importantes y abundantes las vitaminas liposolubles y las vitaminas hidrosolubles.

Al primer grupo pertenecen las Vitaminas A, D, E, F, ácidos grasos esenciales, K. En el segundo grupo se encuentran las vitaminas B1, B2, B6, B12, C, la niacina, el ácido pantoténico, la biotina, el ácido fólico, entre otros.

La Vitamina A y E, Son de gran interés nutricional, porque poseen acción antioxidante, es decir, constituyen un factor protector frente a ciertas enfermedades degenerativas, cardiovasculares y al cáncer.

1.2.1.6. Sales minerales

Los peces marinos y mariscos contienen cantidades considerables de Na, K, Ca, Mg, Fe, Cl, P, F, Se. Así mismo contienen I, Cu y Zn

1.2.1.7. Hidratos de carbono

Su contenido es poco significativo. (Peña, 2010)

Tabla 2: Composición química del pescado

Contenido	Pescado
Energía	94.0 cal
Proteína	19.2 gr
Grasas	1.3 gr
Calcio	32.0 mg
Fosforo	265.0 mg
Hierro	0.9 mg
Vitamina A	5.0 mg

Fuente: (Peña, 2010)

1.3. HIDROLISIS

La palabra hidrólisis, deriva de dos palabras griegas, por un lado, hidro, que significa “agua”, y por otro lado lisis, que significa “rotura”. Cuando se trata de la reacción de los iones de una sal con un disolvente ya sea éste, agua u otro, recibirá el nombre de solvólisis. Algunas sales en disolución acuosa tienen un comportamiento ácido o básico ya que los iones producidos en la disociación son capaces de transferir iones H⁺ al agua, o también recibirlos de ella. (Mendes, 2010)

1.3.1. Hidrolisis de una sal.

Las sales se forman en la neutralización de los ácidos y las bases. Con lo que una disolución acuosa de una sal debe tener carácter neutro. Por lo cual el proceso de la sal afecta al pH y se llama hidrolisis (ruptura por agua) por lo que se define, como la reacción ácido base que pueden llevar a cabo los iones de una sal con el agua.

Los hay cuatro grupos:

- Sales procedentes de un ácido fuerte y una base fuerte
- Sales de base fuerte y ácido débil
- Sales de base débil y ácido fuerte
- Sales de ácido débil y ácido débil (Fernandez, 2014)

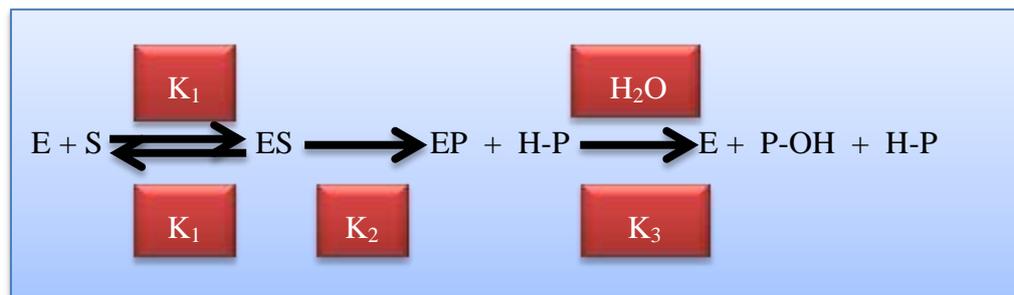
1.3.2. Hidrolisis enzimática

La hidrólisis enzimática se produce mediante un grupo de enzimas llamadas hidrolasas. Estas enzimas ejercen un efecto catalítico hidrolizante, es decir, producen la ruptura de enlaces por agua según: $H-OH + R-R' \rightarrow R-H + R'-OH$. Se nombran mediante el nombre del sustrato seguido de la palabra hidrolasa, y cuando la enzima es específica para separar un grupo en particular, éste puede utilizarse como prefijo. En algunos casos este grupo puede ser transferido por la enzima a otras moléculas y se considera la hidrólisis misma como una transferencia del grupo al agua. (Benitez, 2008)

1.3.3. Etapas de la hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática no se desarrolla en una sola reacción. Se trata de un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio, lo que da una gran complejidad a este tipo de procesos. Se propone un proceso de hidrólisis constituido por tres reacciones consecutivas. Primero, la formación de un complejo enzima-sustrato (proteína), y después la rotura del enlace amídico dando como resultado la liberación de un péptido. Finalmente, el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. Como se muestra en la figura 2 (Benitez, 2008)

Figuras 2: Mecanismo catalítico de una proteína



Fuente: (Benítez1, 2008)

E: enzima, **S:** sustrato, **P, P':** péptidos resultantes, **K_x:** constante velocidad de reacción.

1.3.4. Condiciones de la hidrólisis enzimática

Las principales condiciones para determinar un buen hidrolizado son temperatura, pH, relación enzima sustrato y el tiempo de reacción. Los primeros 3 factores determinan la velocidad de reacción y pueden influir en la especificidad de la enzima. El tiempo de reacción solamente determina el grado final de hidrólisis. Los efectos interactivos entre los parámetros de la hidrólisis también influyen en la composición del hidrolizado. Si el proceso de hidrólisis no se controla, el pH de la solución cambiará después del inicio de la hidrólisis debido a la formación de grupos amino nuevos, los cuales son capaces de liberar o aceptar protones, dependiendo del pH de la hidrólisis. A un pH bajo todos los grupos amino están protonados y solamente parte de los grupos carboxilo están desprotonados, resultando en una captación neta de protones por cada enlace peptídico roto, causando un incremento del pH. A pH neutro y alcalino la hidrólisis resulta en una disminución de pH, pues todos los carboxilos están desprotonados y solamente parte de los grupos amino que están protonados con el fin de prevenir un cambio de pH durante la hidrólisis. (Benitez, 2008)

1.3.5. Característica de los hidrolizados enzimáticos

En los hidrolizados enzimáticos se potencian diversas características funcionales, tales como viscosidad baja, mayor capacidad de agitación, dispersión y alta solubilidad, que conceden las ventajas para el uso en muchos productos alimenticios, respecto a las proteínas originales. (Benitez, 2008)

1.4. HIDROLISIS DE PROTEÍNA

La hidrólisis proteica se realiza normalmente en un reactor, con control de agitación, pH, temperatura y tiempo del proceso. El sustrato se disuelve en agua hasta que el pH y la temperatura se estabilizan; a continuación se agrega la proteasa dando inicio a la hidrólisis. A medida que ésta progresa se produce una disminución del pH debido a la rotura de los enlaces peptídicos. En los casos de hidrólisis enzimática el pH debe ser mantenido en el óptimo de la enzima mediante la adición de base diluida. Para finalizar la hidrólisis proteica la enzima puede ser inactivada con calor, mediante una disminución del pH o con una combinación de ambos. También puede ser retirada del medio mediante filtración y la proteína finalmente precipitada. (Benitez, 2008)

1.4.1. Importancia de los hidrolizados de proteína

Una de las aplicaciones más importantes de los hidrolizados de proteínas es su utilización como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas enterales con destino a la alimentación infantil y de adultos enfermos. Estas dietas entéricas se diseñan para ser absorbidas en el intestino sin una digestión previa en el estómago y son esenciales en el tratamiento de pacientes con desórdenes estomacales o problemas de la mucosa intestinal, así como en lactantes con síndromes de malabsorción, malnutrición, con cuadros alérgicos en la mayoría de los casos. Las características que deben cumplir estos hidrolizados de proteínas para formar parte de una dieta enteral son:

- Que sean osmóticamente equilibrados
- Que sean hipo alérgicos
- Presentar un alto valor nutritivo, comparable al de la proteína de partida
- Y tener un sabor agradable. (Guadix, 2000)

1.4.2. Ventajas de la hidrólisis de proteína.

Para ello, la hidrólisis enzimática presenta indudables ventajas frente a la tradicional hidrólisis química, ácida o alcalina, entre las que cabe mencionar las siguientes:

1.4.2.1. Selectividad

Las enzimas son específicas para un tipo determinado de enlace y, por tanto, no es frecuente la aparición de productos de degradación. En cambio, la poca selectividad de los ataques ácido y básico y su difícil control conduce inevitablemente a la aparición de productos de degradación que pueden llegar a ser tóxicos.

1.4.2.2. Condiciones moderadas de temperatura y pH.

La hidrólisis enzimática transcurre generalmente en el intervalo de 40° a 60°C y pH comprendido entre 4-8. No se añaden sustancias extrañas evidentemente no es así en los procesos de hidrólisis química, ya que la necesaria neutralización posterior eleva considerablemente el contenido en sales se mantiene el valor nutritivo.

Ya que no se produce degradación de los componentes separados, mientras que la hidrólisis alcalina destruye los aminoácidos arginina y cisteína y la hidrólisis ácida elimina el triptófano y desamina los aminoácidos serina y treonina. (Guadix, 2000)

1.4.3. El sustrato en los hidrolizados proteicos

El material de partida utilizado para la obtención de los hidrolizados proteicos puede ser de origen animal, vegetal o bacteriano. Entre los vegetales, los más usados son las proteínas de soja, trigo y arroz, principalmente en países desarrollados. De los sustratos de origen animal se emplea el pescado, principalmente en países orientales, como Japón o Corea. También se han aprovechado las proteínas de residuos cárnicos. Para la elección de una fuente proteínica adecuada debe tenerse en cuenta el uso que vaya a tener el hidrolizado, así como el valor agregado del producto final con respecto al sustrato inicial. (Benitez, 2008)

1.4.4. Propiedades funcionales de un hidrolizado de proteína

Los cambios de las características moleculares que ocurren durante la hidrólisis de la proteína pueden dar lugar al comportamiento tecno-funcional modificado del hidrolizado cuando se lo compara con la proteína intacta, por ejemplo solubilidad alterada, viscosidad, características sensoriales, emulsión y características de la espuma.

1.4.4.1. Solubilidad

En el punto isoeléctrico de la proteína, la solubilidad generalmente aumenta con la hidrólisis, ya que es principalmente el resultado de la reducción en peso molecular y del aumento en el número de grupos polares. El efecto de la hidrólisis sobre la solubilidad a otros valores de pH depende de la proteína estudiada.

1.4.4.2. Sabor amargo

Un efecto secundario negativo importante de la hidrólisis de la proteína es la liberación de los péptidos generalmente con sabor más amargo que la proteína nativa. Se ha demostrado que el sabor amargo de los péptidos puros, a pesar de depender de la fuente de proteína y de la especificidad de la enzima, está relacionado con la presencia y posición de aminoácidos hidrofóbicos en los péptidos del hidroliza

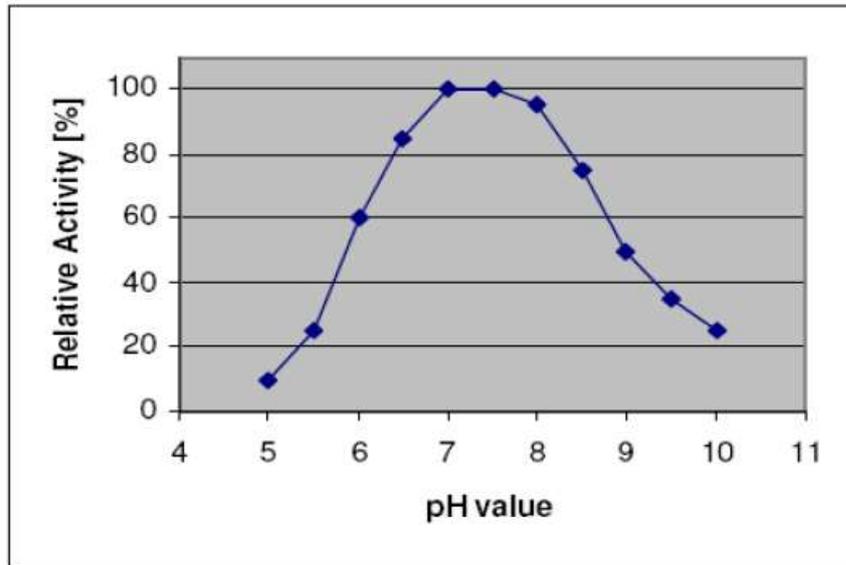
1.4.4.3. Emulsiones y espuma

Las características de la emulsión y de formación de espuma de la proteína y de los hidrolizados de la proteína dependen del pH del sistema y de la enzima empleada para la hidrólisis la emulsión y formación de espuma de la caseína, que está de acuerdo con los resultados del investigador. (Benitez, 2008)

1.4.5. Condiciones de la hidrólisis

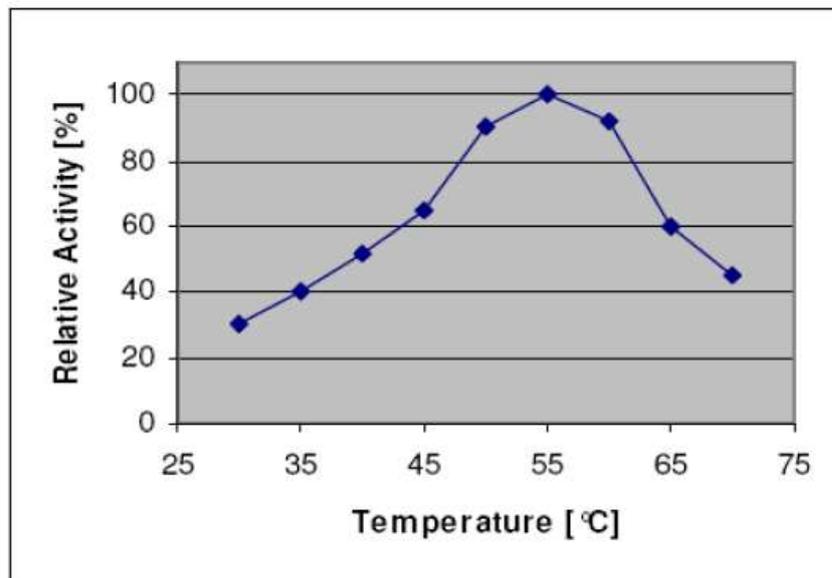
El valor del pH óptimo para la actividad enzimática de la enzima está en el rango de pH de 6-7 y temperaturas de 32 – 50 ° C. GRANOZYME ACC es inactivada rápidamente a valores de pH de 7,5 y temperaturas mayores a 55°C.

Figuras 3: Actividad de la enzima dependiente de pH



Fuente: (Granotec, 2013)

Figuras 4: Actividad de la enzima depende de la temperatura (° C)



Fuente: (Granotec, 2013)

1.5. ENZIMAS

Las enzimas son proteínas que catalizan todas las reacciones bioquímicas. Además de su importancia como catalizadores biológicos que permiten que las reacciones metabólicas ocurran a gran velocidad en condiciones compatibles con la vida y tienen muchos usos médicos y comerciales. Un catalizador es una sustancia que disminuye la energía de activación de una reacción química. De acuerdo a su complejidad las enzimas se clasifican simples formado por una cadenas polipeptídicas como la lisozima, tripsina, pepsina y otras están compuestas por más de una sola cadena polipeptídicas. Las enzimas tienen la capacidad de catalizar reacciones químicas de manera muy específica, es decir, su intervalo de acción se limita a un determinado tipo de compuesto que debe reunir ciertas características estructurales para que pueda ser utilizado como sustrato. (Baudi, 2006)

1.5.1. Clasificación de las enzimas.

Se han clasificado por su nombre ya que en algunos casos se ha tomado como raíz el nombre del sustrato que reconoce la enzima y son las siguientes:

1.5.1.1. *Hidrolasas*

Llevan a cabo la ruptura de enlaces covalentes con la introducción de una molécula de agua. Las enzimas hidrolíticas son las que se utilizan, con mayor frecuencia, como aditivos en la industria alimentaria

1.5.1.2. *Isomerasas*

Catalizan el rearrreglo especial de grupos del sustrato sin modificar su composición química. Y son epimerasas y racemasas.

1.5.1.3. *Ligasas*

Promueven la unión covalente de dos moléculas acopladas con la ruptura de un enlace pirofosfato proveniente de ATP, UTP o CTP, como fuente de energía.

1.5.1.4. *Liasas*

Rompen enlaces para la eliminación de un determinado grupo químico del sustrato y forman dobles ligaduras, es la introducción de moléculas de agua. Las decarboxilasas y aldolasas son ejemplos de liasas.

1.5.1.5. Oxidorreductasas

Catalizan reacciones de óxido-reducción. Facilitan la transferencia de electrones de una molécula a otra.

1.5.1.6. Transferasas

Catalizan la transferencia de un grupo de una sustancia a otra. Ejemplo la transmetilasa es una enzima que cataliza la transferencia de un grupo metilo de una molécula a otra. (Baudi, 2006)

1.5.2. Factores que afectan la actividad enzimática.

La velocidad a la que las reacciones enzimáticas proceden depende de varios factores, dentro de los que destacan el pH del medio de reacción, la temperatura, la concentración del sustrato y de enzima, y el agua disponible en el medio, entre los más importantes:

1.5.2.1. Concentración del sustrato

Una enzima funciona de manera más eficiente cuando la concentración de sustrato está en exceso en relación con la concentración de enzimas. En estas condiciones el producto se obtiene a la máxima velocidad posible para la cantidad de enzima presente, después de que se alcanza esta velocidad, un aumento en la concentración del sustrato.

1.5.2.2. Concentración de la enzima.

Siempre y cuando haya sustrato disponible, un aumento en la concentración de la enzima aumenta la velocidad enzimática hacia cierto límite.

1.5.2.3. Temperatura

Un incremento de 10°C duplica la velocidad de reacción, hasta ciertos límites. El calor es un factor que desnaturaliza las proteínas por lo tanto si la temperatura se eleva demasiado, la enzima pierde su actividad.

1.5.2.4. pH

El pH óptimo de la actividad enzimática es 7, excepto las enzimas del estómago cuyo pH óptimo es ácido. Los valores de pH o temperatura óptimos varían según la enzima pero en todos los casos permiten que la estructura del sitio activo sea la más adecuada para la catálisis.

1.5.2.5. Presencia de cofactores

Muchas enzimas dependen de los cofactores, sean activadores o coenzimas para funcionar adecuadamente. Para las enzimas que tienen cofactores, la concentración del cofactor debe ser igual o mayor que la concentración de la enzima para obtener una actividad catalítica máxima. (Baudi, 2006)

1.6. PROTEASAS

Las enzimas proteasas o proteolíticas son un grupo de enzimas que descompone en unidades más pequeñas las proteínas las mismas que rompen la cadenas largas de moléculas que forman las proteínas formando fragmentos más cortos llamados péptidos que son moléculas formadas por aminoácidos estos están presentes en bacterias y plantas pero son más abundantes en los animales. También se producen de forma natural en el organismo y constituye entre el 1 % y el 5 % del contenido genético. Su acción es compleja, pues tiene otro grado de especificidad, ya que puede preferir atacar el enlace péptico entre aminoácidos específicos. Existen proteasas de origen vegetal (papaína, ficina y bromelina), animal (pepsina, tripsina y quimotripsina) y microbianas (de hongos y bacterias). Pueden tener acción endo u exo; en este último caso pueden ser carboxipeptidasas si remueven el último aminoácido del extremo carboxilo, o aminopeptidasas si lo hacen del extremo amino. (Baudi, 2006)

Las enzimas proteasas le ayudan a digerir las proteínas contenidas en los alimentos. Aunque su cuerpo produce esas enzimas en el páncreas, ciertos alimentos también contienen enzimas proteolíticas. Las primeras enzimas utilizadas en la industria alimentaria fueron de origen animal, vegetal, y bacterianas. Estas enzimas proteolíticas se encuentran en la papaya y la piña son dos de las fuentes de plantas más ricas, como se atestigua por su uso tradicional como "ablandadores" naturales para la carne. La papaína y la bromelina son los nombres respectivos para las enzimas proteolíticas que se encuentran en estas frutas. El principal uso de las enzimas proteolíticas es como una ayuda digestiva para la gente que tiene problemas para digerir proteínas. Sin embargo, por razones que son menos claras, las enzimas proteolíticas también parecen reducir el dolor, la inflamación y para demostrar la calidad de un hidrolizado enzimático lo adecuado es consultar las pautas establecidas por la USP en EEUU, o el código de sustancia química alimentaria. (Birdsall, 2002)

1.6.1. Mecanismo de acción

Su mecanismo de acción es complejo, pues tiene otro grado de especificidad, ya que pueden preferir atacar el enlace peptídico entre aminoácidos específico. Y estos se pueden clasificar de acuerdo a la química de sus mecanismos catalíticos que pueden ser: serino, tiol, metalo proteasas y proteasas ácidas:

1.6.1.1. Serino

Poseen un hidroxilo en su sitio activo y además contiene otros residuos importantes para la catálisis son un grupo imidazol y un aspartato. Todos son endopeptidasas y son inhibidas por DFP que reacciona covalentemente con la serina catalítica. Su Ph es de 7.5 a 10.5.

1.6.1.2. Tiol proteasas

Requieren el grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína en el sitio activo junto a otros residuo importantes para la catálisis son el carboxilo y el histidilo. El Ph es de 4.5 a 9.5

1.6.1.3. Las metalo proteasas

Requieren la presencia de un ion metálico, como el Zn o Mn en el sitio activo y en general son exopeptidasas. Se inhiben en presencia de agentes quelantes. Tienen un Ph cercano a 7.

1.6.1.4. Las proteasas ácidas

Necesitan un grupo de carboxilo en el sitio activo, generalmente proveniente de un aspartato. Su rango de PH óptimo está entre 2 y 4. (Baudi, 2006)

2. MÉTODOS Y TÉCNICAS

2.1. LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

El presente estudio es realizado en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica 1 de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud de la Universidad Técnica de Machala.

Coordenadas de la universidad Técnica de Machala

- Latitud: $3^{\circ}17'9.18''$ S
- Longitud: $79^{\circ}54'42.91''$ O

Figuras 5: Coordenadas de la universidad Técnica de Machala



Fuente: (Google Earth, 2015)

2.1.1. Caracterización de la zona de obtención de la materia prima

La laguna de la Tembladera es un importante humedal, ubicado en la provincia de El Oro, cantón Santa rosa, comuna San José. Tiene una extensión de 110 hectáreas y es un reservorio natural muy importante para las áreas de cultivos como arroz, el plátano y los cítricos. Actualmente recibe una cuota importante de aguas del Río arenillas, para que en las épocas de estiaje provea a cultivos y ganadería, sin ver afectado su volumen hídrico. Su temperatura promedio es de 28°C . Su flora conforma un verde marco que realza el color de las aguas y crean el hábitat propicio de innumerables aves, pájaros, truchas, tilapias y viejas azules etc. (MAE, 2013).

Figuras 6: Humedal “La Tembladera”



Fuente: Ortega 2015

Coordenadas de la Laguna

- Latitud 3°29'16.46''S
- Longitud 80°0'2.72''O

Figuras 7: Fotografía satelital de la laguna “La Tembladera”



Fuente: (Google Earth, 2015)

2.2. MUESTRA

La muestra utilizada para la obtención de filetes fue de 10 kg de vieja azul entre pescado de un tamaño promedio de 12 cm de longitud. Como se muestra en la siguiente figura 8.

Figuras 8: Filete de pescado



Fuente: Ortega 2015

2.3. MÉTODO

2.3.1. Tipo de investigación

Esta investigación es de carácter descriptivo y experimental

2.3.1.2. *Descriptivo*

Se evaluó los diversos aspectos del pescado, concentración de enzima, humedad, proteína, grasas y cenizas tanto de la materia prima como del hidrolizado.

2.3.1.3. *Experimental*

Las características específicas de la investigación experimental fueron la manipulación de la variable independiente y el control de la variable dependiente. La variable independiente fue la concentración de la enzima y la temperatura de hidrólisis, para posterior medición de la variable dependiente (% de Hidrolizado).

2.3.2. Diseño de la investigación

Se hidrolizo proteína de pescado, utilizando enzimas GRANOZYME ACC, para la determinación de la concentración óptima de enzima cercano al 100 % bajo las condiciones de pH y temperatura adecuada para lo cual se aplicara un diseño experimental. Como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Diseño factorial del experimento

Factor A		Factor B	
		Temperatura	
Enzima (%)		B1=T1=28°C	B2=T2= 55°C
A1=1 ml	A1*B1	A1*B2	
A2=2 ml	A2*B1	A2*B2	
A3=3 ml	A3*B1	A3*B2	

Fuente: ortega 2015

Se realizó 6 tratamientos con 12 réplicas de acuerdo al factor A y B donde se aplicó 1 ml, 2 ml, 3 ml de enzima con una temperaturas de 28 °C y 55 °C por 24 horas. Que dando de la siguiente manera los tratamientos.

Tratamientos Resultantes

A= 1% a una temperatura de 28 °C

B= 1% a una temperatura de 55 °C

C= 2% a una temperatura de 28 °C

D= 2% a una temperatura de 55 °C

E= 3% a una temperatura de 28 °C

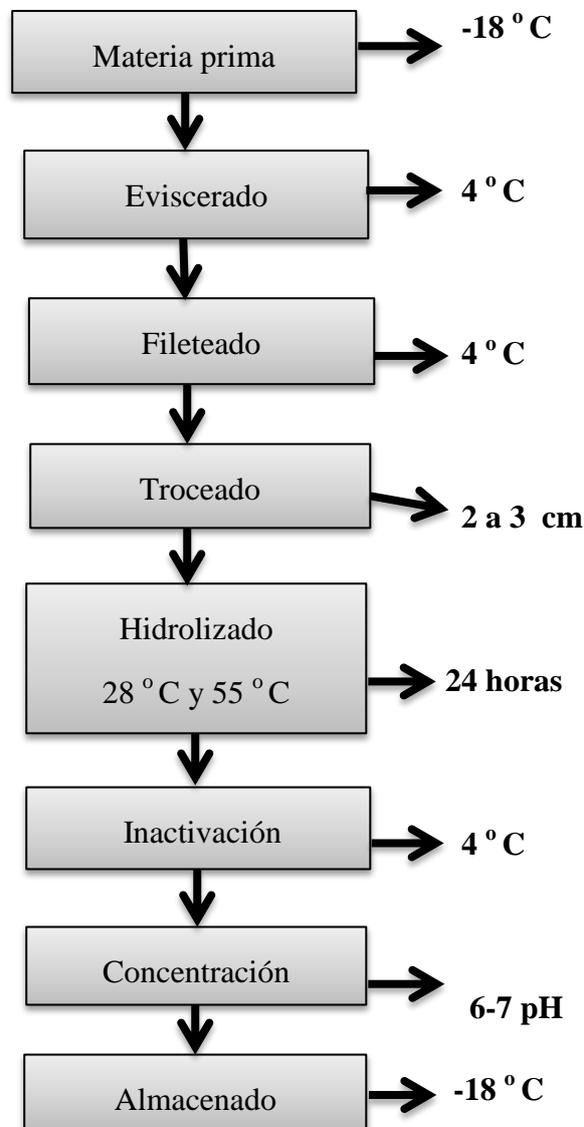
F= 3% a una temperatura de 55 °C

Donde los tratamientos A (1 ml), C (2 ml) y E (3 ml) realizados a una temperatura de 28 °C por 24 horas estos no se hidrolizarón, ya que la enzima no catalizo al sustrato a esta temperatura. Mientras que los tratamientos B (1 ml), D (2 ml) y F (3 ml) realizados con una temperatura de 55 °C por 24 horas, si se hidrolizarón alcanzando el tratamiento D mayor porcentaje de hidrolizado cercano al 100 %.

2.3.3. Diagrama de flujo del hidrolizado de proteína de pescado

A continuación se presenta el siguiente diagrama de flujo de la obtención de hidrolizado de carne de vieja azul. Como se muestra en la figura 9

Figuras 9: Diagrama de flujo del hidrolizado proteico



Fuente: Ortega 2015.

2.3.4. Descripción del diagrama de flujo

2.3.4.2. *Materia prima*

La materia prima del pescado de *Aequidens rivulatus* (vieja azul) es rica en proteína cuyo tiene que estar a una temperatura -18°C para que no haya contaminantes y este sano que no pueden causar cambios en la investigación

2.3.4.3. *Eviscerado*

Se separa la cabeza, las aletas, la cola y las vísceras del pescado para lavar con abundante agua para su posterior refrigeración a una temperatura de 4°C .

2.3.4.4. *Fileteado y troceado*

El fileteo se lo realizo para separar la piel del pescado con la carne o pulpa de pescado se lava con abundante agua para luego trocearlo en pedazos de 2 a 3 cm y se pesa 100 gr de carne en tarrinas de aluminio.

2.3.4.5. *Hidrolizado*

Esto se lo realiza con la activación de las enzimas en la que se coloca 1 ml, 2 ml y 3 ml de enzima en 100 ml de agua y 100 gr de pescado a una temperatura de 28°C ambiente y 55°C en la estufa por 24 horas y se tapa con papel de aluminio.

2.3.4.6. *Inactivación*

Se saca el hidrolizado de la estufa y se coloca en refrigeración a 4°C por 15 min para la determinación del pH, proteína, humedad, grasa, ceniza y viscosidad.

2.3.4.7. *Concentrado*

Para medir la concentración del hidrolizado se filtra y se pesa el residuo de cada hidrolizado realizado con las diferentes concentraciones de enzimas.

2.3.4.8. *Almacenado*

Se lo almaceno a temperatura de congelación -18°C en un lugar limpio.

2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

Se aplican para producir los datos de la composición química de los alimentos que deben ser apropiados, utilizar técnicas analíticas exactas y ser realizados por analistas entrenados. (LA FAO, 2013)

En este caso se va a caracterizar la materia prima y el hidrolizado.

2.4.1. Método para la determinación del pH

La determinación del pH se la realizó filtrando 100 ml del hidrolizado e introduciendo el electrodo del equipo Multiparametros (pH/ISE/CONDUCTIVIDAD/DO) TIPO ORION STAR A 329 digitales (A.O.A.C. 32.016).

2.4.2. Método para la determinación de la viscosidad

Se determina la viscosidad cinemática utilizando un viscosímetro cannon en el que se le determina el tiempo de viscosidad con una constante del viscosímetro ($0.5 \text{ mm}^2/\text{s}^2$).

$$V = t \times \text{constante del viscosímetro}$$

2.4.3. Método para la determinación de Proteína

2.4.3.2. Método de digestión de persulfato UHR (20 a 100 mg/L N)

- Muestra recomendado y la temperatura del reactivo es de 15-25 ° C. Temperatura de almacenamiento recomendada es reactivo 15-25 ° C.
- PH de la muestra recomendada es de entre 3-12.
- La digestión se requiere para la determinación de nitrógeno total.
- Si la prueba no se realiza a la temperatura recomendada se puede obtener un resultado incorrecto.
- Utilice sólo agua de alta calidad desionizada o agua Orgánica gratuito para preparar normas de nitrógeno o hacer diluciones de muestras y blancos de reactivo.
- Métodos TNT plus se activan desde el menú principal cuando se inserta el vial de muestra en el soporte de celda de muestra.
- Solución de hidróxido de sodio A, oxidante tableta B, Micro Cap C y D.
- Después de la adición de los reactivos A, B, D y C las botellas de reactivos deben cerrarse inmediatamente (HACH COMPANY, 2005).

Procedimiento

1. Encender el reactor DRB 3900.
2. Añadir 2 ml de muestra, 3 ml de solución D hidróxido de sodio y una tableta de reactivo B.
3. Se coloca en rápida sucesión a una probeta de 20 ml.
4. Se añade 1 micro cap C a la probeta.
5. Tapar e invertir la probeta de reacción.
6. Pipetear 1 ml de muestra de la probeta a una cubeta de ensayo.
7. Pipetear 2 ml de solución D.
8. Tapar rápidamente e invertir la cubeta de ensayo.
9. Esperar que se temporice 15 min.
10. Después que suene el temporizador limpie bien el interior de la cubeta.
11. El resultado aparecerá en mg/L.

2.4.4. Método para la determinación de ceniza

Esta norma establece el método para determinar el contenido de cenizas. (INEN 0467)

Procedimiento

- Se pesa el crisol vacío.
- Calentar el crisol de porcelana en la mufla ajustada a $530^{\circ} \pm 20^{\circ}\text{C}$ durante 30 min. Enfriar en el desecador.
- Transferir al crisol y pesar, aproximadamente 2 g de muestra.
- Colocar el crisol con su contenido cerca de la puerta de la mufla abierta y mantenerla allí durante unos pocos minutos para evitar pérdidas por proyección de material, lo que podría ocurrir si la cápsula se introduce directamente en la mufla.
- Introducir el crisol en la mufla a 530°C hasta 4 horas para obtener cenizas libres de partículas de carbón.
- Sacar el crisol con las cenizas de la mufla, dejar enfriar en el desecador y pesar.

Cálculos

El contenido de grasa se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$C = \frac{m_2 - m}{m_1 - m} \times 100$$

Siendo:

- C = contenido de cenizas en la harina, en porcentaje de masa.
- m = masa del crisol vacía, en g.
- m1 = masa del crisol con muestra (antes de la incineración), en g.
- m2= masa del crisol con las cenizas (después de la incineración), en g.

2.4.5. Método para la determinación de grasas

Separar, mediante acidificación y centrifugación, la materia grasa contenida en el producto analizado y determinar el contenido de grasa, mediante lectura directa en una probeta de 10 ml. (INEN 0300)

Procedimiento

1. La determinación debe realizarse por duplicado sobre la misma muestra preparada.
2. Pesar aproximadamente 5 g de muestra preparada, y transferir al tubo de ensayo y tapar.
3. Luego añadir 5 ml, exactamente de cloro form en el tubo de ensayo.
4. Tapar herméticamente el cuello del tubo de ensayo y agitar.
5. Inmediatamente después de la agitación, centrifugar el tubo de ensayo con su tapa colocada hacia afuera. Se equilibrándolos con uno que contenga igual.
6. Una vez que la centrífuga alcanza la velocidad necesaria, continuar la operación durante un tiempo no menor de 10 min ni mayor de 15 min a tal velocidad.
7. Retirar el tubo de ensayo de la centrífuga y se lo coloca en una probeta de 10 ml para medir el contenido de grasa.
8. Se proceder a dar la lectura, colocar el nivel de separación entre el cloro form y la columna de grasa, sobre la marca de una probeta graduación de 10 ml. Leer las medidas correspondientes a la parte inferior del menisco de grasa; la diferencia entre las dos lecturas da el contenido de grasa.

2.4.6. Método para la determinación de la humedad

El método es aplicable a alimentos sólidos, líquidos o pastosos no susceptibles a degradación al ser sometidos a temperaturas superiores a 105 ° C. Este método es inadecuado para productos ricos en sustancias volátiles distintas del agua. (INEN 0222)

Procedimiento

1. Se pesa la capsula vacía y con muestra.
2. Se pesa aproximadamente 10 g de muestra preparada y distribuir de tal forma que presente la mayor superficie posible.
3. Se coloca la capsula junto con su contenido en la estufa a una temperatura de 105 ° C por 2 horas.
4. Se saca de la estufa y se la coloca en desecador por 10 min.
5. Se pesa la capsula con la muestra seca en una balanza analítica y se realiza los cálculos correspondientes. **Cálculos**

El contenido de humedad se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$H = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} 100\%$$

Siendo:

- H = contenido de humedad.
- m1 = peso de la capsula vacía.
- m2 = peso de la capsula vacía más muestra.
- m3= peso de la capsula desecada.

2.4.7. Método para la determinación de aerobios mesófilos y coliformes

El análisis microbiológico de alimentos no tiene carácter preventivo sino que simplemente es una inspección que permite valorar la carga microbiana. Esto se lo realiza en todos los alimentos en general y se sigue normas establecidas donde determinan los límites máximos permitidos como es el boletín Real del Estado Español. (B.O.E, 2008)

Procedimiento

3. Se esteriliza todos los materiales a utilizar.
4. Se pesa 10 ml de muestra.
5. Se prepara las láminas Petrifilm.
6. Se coloca directo 1 ml de muestra en cada Petrifilm.
7. Se lo lleva a la estufa a incubar a una temperatura de 30 °C por 48 horas.
8. Se saca de la estufa des pues de las 48 horas para el conteo de colonias correspondiente.
9. Se coloca cada lamina Petrifilm en el contador de colonias.
10. Las colonias son unos puntos de color negro en aerobios mesófilos y en coliformes de color rosaditos.

2.5. VARIABLES

2.5.1. Variable independiente

- Concentración de enzima
- Temperatura de hidrolisis

2.5.2. Variable dependiente

- % de hidrolizado obtenido

2.6. RECURSOS A EMPLEAR

2.6.1. Humanos

- Investigador
- Tutor

2.6.2. Químicos

- Reactivos
- Agua destilada
- Enzima proteolítica

2.6.2.1. *Reactivos para la determinación de proteínas*

- Hidróxido de sodio = A

- TNT plus= D
- Micro Cap = C
- tableta oxidante = B

2.6.2.2. *Reactivos para la determinación de grasa.*

- Cloro form

2.6.3. Físicos

2.6.3.1. *Equipos y utensilios*

- Cuchillos
- Bandejas de aluminio
- Bandejas
- Mesón
- Multiparametros (pH, oxígeno disuelto)
- Espectrofotómetro UV-visible marca hach DR 3900

2.6.3.2. *Materiales de laboratorio para determinar proteínas, grasas, ceniza.*

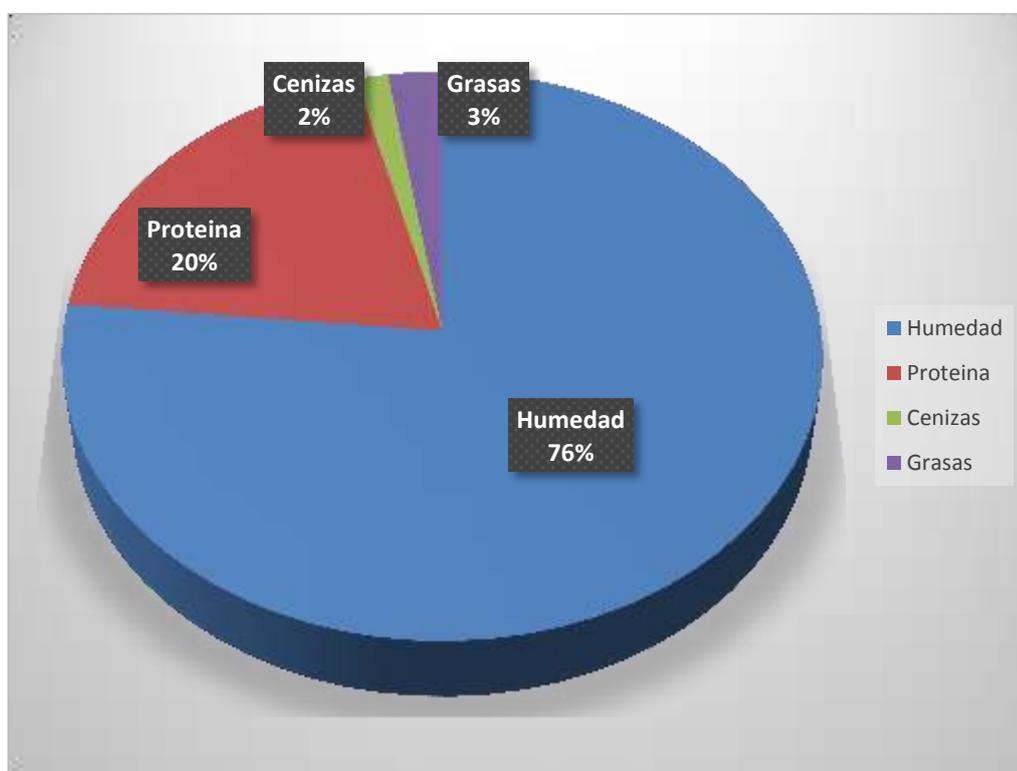
- Balanza analítica
- Tubos de ensayos
- Estufa
- Desecador
- Centrifuga
- Crisol
- Peso filtro
- Tapones
- Probeta 10 ml
- Pipetas volumétricas de 1 ml y 10 ml
- Mufla
- Papel filtro
- Petrifilm de coliformes y aerobio mesófilos
- Contador de colonias
- Mechero de alcohol

3. ANÁLISIS Y RESULTADOS

3.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA MATERIA PRIMA (VIEJA AZUL)

La necesidad de caracterizar las materias primas es de vital importancia, ya que permite la identificación su origen, fuente de las que proviene, información sobre los procesos a que son sometidos y su composición química. (Obando, 2010).

Figuras 10: Composición fisicoquímica de la carne del pescado vieja azul



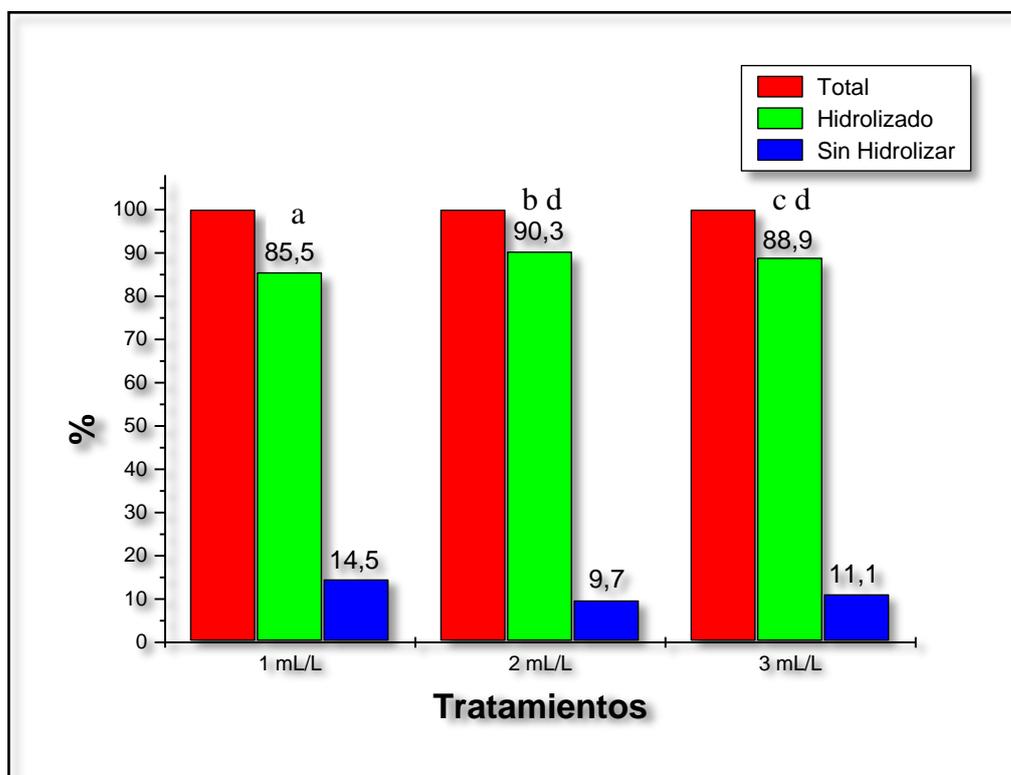
Fuente: Ortega 2014

Como podemos apreciar la figura 10 la carne de pescado *Aequidens rivulatus* (vieja azul) es una fuente significativa de proteínas (20 %), lo cual facilitara el hidrolizado mediante la aplicación de enzimas proteasas (GRONOZYME ACC).

3.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ENZIMAS PARA ALCANZAR UN PORCENTAJE DE HIDROLIZADO CERCANO AL 100 %.

La finalidad de variar la concentración de enzimas de la marca comercial GRAMOZYME ACC en la carne de pescado fue lograr un hidrolizado cercano al 100% a una temperatura de 55 °C por 24 horas. A continuación en la figura 11 se muestran los resultados obtenidos al variar la concentración de enzima de los tratamientos.

Figuras 11: Determinación de la concentración de enzimas



Fuente: Ortega 2015

- ❖ Nota. Valores compartiendo la misma letra no son significativos a un nivel de significancia del 5 %

Como podemos ver en la figura 11, los tratamientos D (2 ml/L) y F (3 ml/L) alcanzaron los mayores porcentajes de hidrolizado de proteína de *Aequidens rivulatus* (vieja azul) con un 90,3 y 88,9 % respectivamente y tan solo el 85,5 % en el tratamiento B (1 ml/L). Mediante la prueba de Tukey se determinó que si existe diferencia en los 3 tratamientos

realizados a 55 ° C, el tratamiento que alcanza la mayor media de porcentaje de hidrolizado es el tratamiento D (90,3 %)

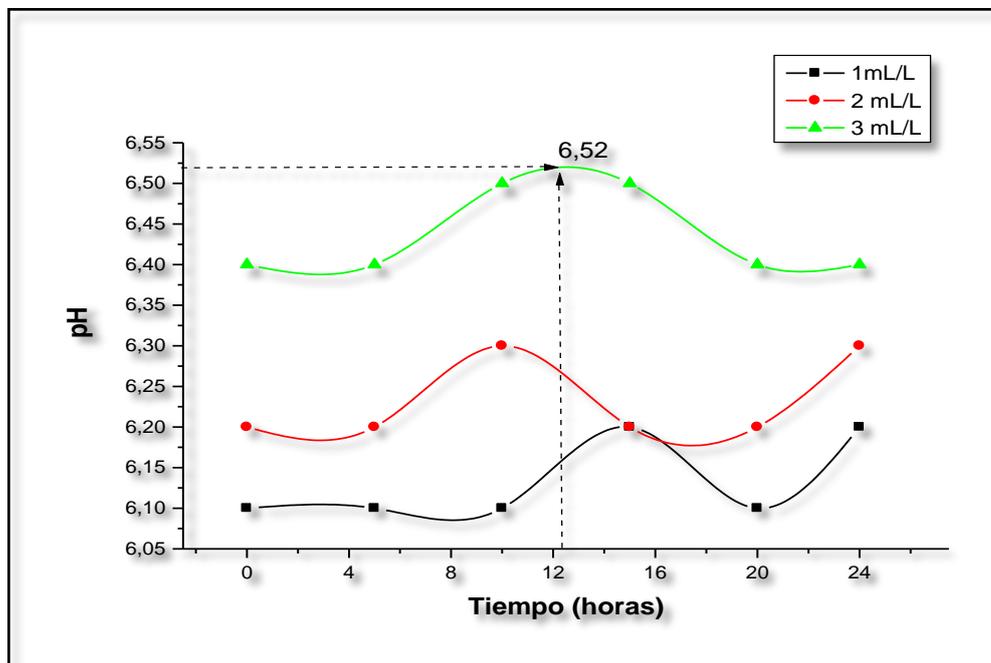
3.3. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE INTERVIENE EN LA HIDROLISIS ENZIMÁTICAS (pH, NITRÓGENO TOTAL, SOLIDOS TOTALES DISUELTOS).

En la hidrolisis enzimática existieron varios parámetros que intervienen como lo fue el pH.

3.3.1. Determinación del pH durante el tiempo de hidrolizado

La evaluación de pH permitió acercarnos a las regiones óptimas de hidrólisis enzimática para las enzimas de carácter GRANOZYME ACC lo que ayudaría a una posterior optimización del proceso para la obtención de péptidos y aminoácidos libres que podrían ser un aporte importante para el desarrollo de productos con valor nutricional apreciable y un valor agregado considerable. (Salazar, 2012)

Figuras 12: Determinación del pH durante el tiempo de hidrolizado



Fuente: Ortega 2015

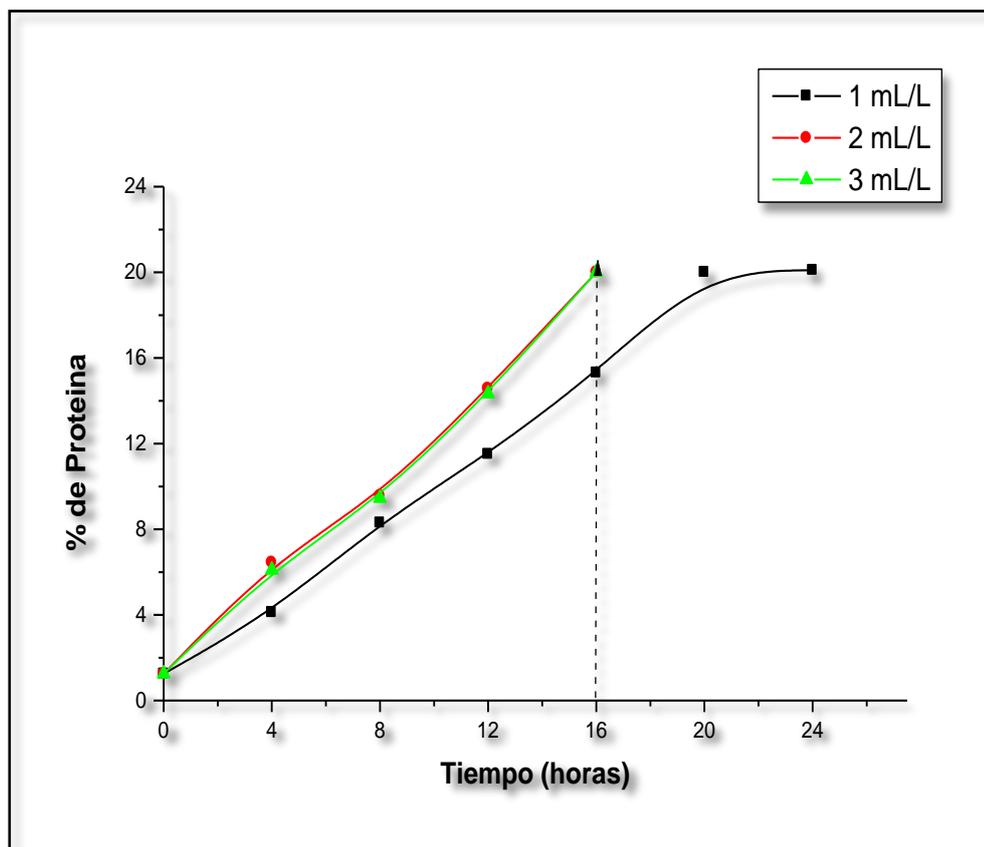
En la figura 12 indica que el pH del hidrolizado permanece constante durante las 10 primeras horas, luego presenta un incremento en el tratamiento B (1 ml/L) de 6,1 hasta

6,2 y luego desciende hasta su punto de partida, mientras que el tratamiento D (2 ml/L) empieza a incrementarse desde la quinta hora desde 6,2 hasta 6,3 y en el tratamientos F (3 ml/L) se incrementa desde la quinta hora desde 6,4 hasta 6,5 y a la hora 20 se estabiliza a 6,4, lo cual indica que a mayor concentración de enzimas el pH comienza a incrementarse con mayor rapidez y tarda mayor tiempo con una ligera variación de pH

3.3.2. Determinación del porcentaje de proteína durante el tiempo de hidrolisis

En la hidrólisis enzimática de proteínas hasta péptidas y hasta aminoácidos, por acción de enzimas proteolíticas, la composición final y, por tanto, el uso de los hidrolizados dependerán principalmente de la fuente proteica, del tipo de proteasa usada, de las condiciones de hidrólisis. (Benitez, 2008)

Figuras 13: Porcentaje de proteína hidrolizada en el tiempo de hidrolisis



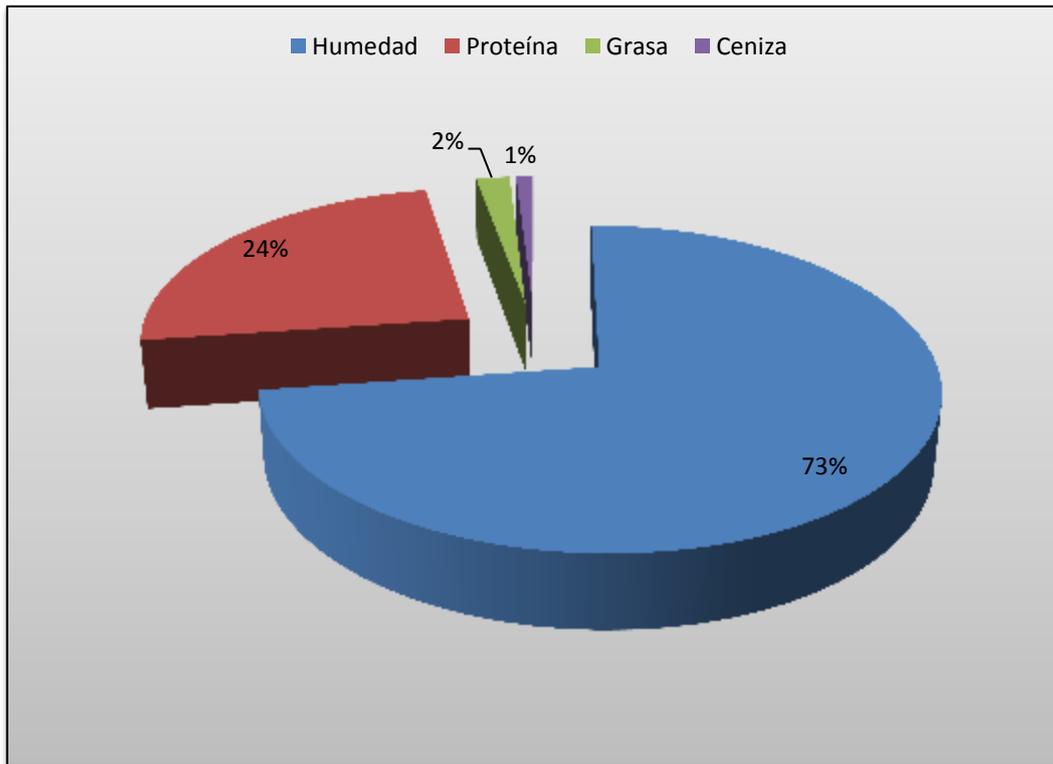
Fuente: Ortega 2015

En la figura 13 nos indica que la concentración de proteína en el hidrolizado se incrementa constantemente, tal es el caso del tratamiento D (2 ml/L) y F (3 ml/L) alcanzan una concentración del 20 en 16 horas de hidrolisis, mientras que el tratamiento

B (1 ml/L) tarda 24 horas en alcanzar el 18 % de proteínas, lo cual indica que a mayor concentración de enzima, menor tiempo de hidrolisis.

3.4. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS EN EL HIDROLIZADO

Figuras 14: Características fisicoquímicas del hidrolizado



Fuente: Ortega 2015

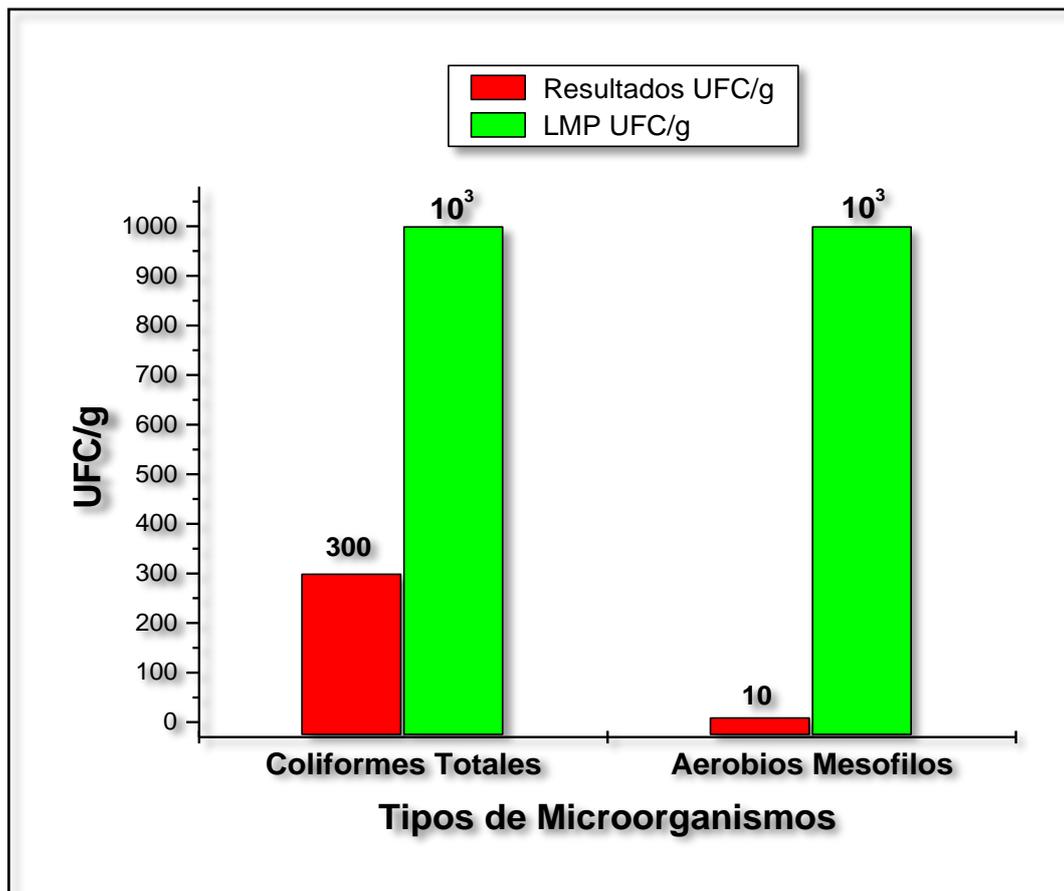
Según la figura 14 nos muestra composición fisicoquímica del hidrolizado enzimático de la carne de pescado, en el cual se obtuvo el 73 % de humedad, el 24 % de proteína, 2 % de grasa, el 1 % de ceniza, el aumento en el contenido de proteína se le atribuye a la cantidad de enzima adicionada en el proceso y a la pérdida de humedad, la viscosidad cinemática del hidrolizado fue de $0,15 \text{ mm}^2 / \text{s}$ lo cual evidencia la eficiencia de las enzimas para hidrolizar la proteína presente en la carne de pescado.

3.5. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS EN EL HIDROLIZADO.

Criterios microbiológicos

Los alimentos deben cumplir con normas microbiológicas correspondientes a su grupo o subgrupo para ser considerados aptos para el consumo humano. (B.O.E, 2008)

Figuras 15: Carga microbiológica



Fuente: Ortega 2015

Como nos indica la figura 15 la carga microbiana del hidrolizado obtenido a partir de la carne de pescado vieja azul, si existe presencia de aerobios mesófilos y coliformes totales, pero no superan los límites máximos permisibles según el Boletín Real del Estado español (BOE).

3.6. ANÁLISIS DE VARIANZA

La herramienta estadísticas utilizada nos permitió determinar las fuentes de variación durante el análisis de la varianza (ANOVA). De esta manera se pudo deducir cual es el factor que tiene efecto significativo en la hidrolisis enzimática de la carne de pescado vieja azul (Boqué, 2011)

A continuación en la tabla 4 se muestra los resultados del análisis de varianza aplicado al experimento estudiado.

Tabla 4: Análisis ANOVA del experimento

Fuente	Media	Varianza	N
1 ml/L	85,51	1,18	3
2 ml/L	90,76	0,25	3
3 ml/L	89,38	0	3

F=46,11

p = 0,0002

Fuente: Ortega, 2015.

Como podemos apreciar en la tabla 5 si existe diferencia significativa entre los tres tratamientos estudiados, el tratamiento que alcanza la mayor media fue el D (2 ml/L de enzima/100gramos de carne de pescado) con 90,76%.

3.6.1. Prueba de Tukey

La prueba de Tukey fue la prueba aplicada, mediante esta prueba se determinó el tratamiento que tiene mayor diferencia significativa con respecto a los demás. Según la prueba de Tukey indica que si hay diferencias entre los 3 tratamientos B (1 ml), D (2 ml) y F (3 ml) realizados. Como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5: Prueba de Tukey

Contraste	Diferencia	\pm Limites
1 ml/L - 2 ml/L	* - 5,25	1,73
1 ml/L - 3 ml/L	* -3,86	1,73
2 ml/L - 3 ml/L	1,38	1,73

Fuente: Ortega 2015

* Indica una diferencia estadísticamente significativa

El procedimiento de comparación múltiple de Tukey nos indica que el tratamiento B (1 ml/L) difiere del D (2 ml/L) y F (3 ml/L), alcanzándose mayor porcentaje de hidrolizado en los tratamientos D y F (90,7 y 89,38 % respectivamente), siendo estos dos tratamientos estadísticamente iguales. Con este método, existe un riesgo de 5,0 % de llamar a uno o más pares significativamente diferente cuando su real diferencia es igual a 0.

3.6.2. Prueba de Hipótesis

Tamaño de la muestra = 9

95,0% intervalo de confianza para sigma: [0, 675457,1, 91577]

Hipótesis nula: desviación estándar = 0,5

Alternativa: no es igual

Computarizada estadístico chi-cuadrado = 32,0

P-valor = 0,000186283

Rechazar la hipótesis alternativa para alfa = 0,05.

Las dos hipótesis para ser probadas son:

Hipótesis nula: sigma = 0,5

Hipótesis alternativa: $\sigma < 0,5$

Dada una muestra de 9 observaciones con una desviación estándar de 1,0, la computarizada estadístico Chi-cuadrado es igual a 32,0. Dado que el P-valor para la prueba es menor que 0,05, la hipótesis nula es rechazada en el 95,0 % nivel de confianza.

H₀= El rendimiento del hidrolizado de proteína de carne de *Aequidens rivulatus* (vieja azul) no es dependiente de la concentración enzimática.

H_a= El rendimiento del hidrolizado de proteína de carne de *Aequidens rivulatus* (vieja azul) si es dependiente de la concentración enzimática.

4. CONCLUSIONES

Según la caracterización de la materia prima se obtuvo un 20 % de proteína con una humedad del 76 %, con el 3 % de grasa y el 2 % de ceniza en el pescado vieja azul, en cambio en el hidrolizado se pudo obtener un 24 % de proteína, con un 73 % humedad, con el 2 % de grasa y el 1 % de ceniza con una viscosidad cinemática del hidrolizado que fue de 0,15 mm²/s según los análisis físicos químicos realizados, esto se debe a la concentración de enzima utilizada y a la pérdida de humedad, lo que nos indica que hay mayor concentración de proteína en el hidrolizado.

De acuerdo a los 6 tratamientos realizados con las 12 réplicas los tratamientos A (1 ml), C (2 ml) y E (3 ml) a una temperatura de 28 °C por 24 horas estos no se hidrolizaron, ya que la enzima no catalizó al sustrato a esta temperatura. Mientras que los tratamientos restantes B (1 ml), D (2 ml) y F (3 ml) a una temperatura de 55 °C por 24 horas sí se hidrolizaron, alcanzando el tratamiento D mayor concentración significativa con un 90,3 % seguido del F con un 88,9 % y tan solo el 85,5 % alcanzó el tratamiento B no obstante no hubo diferencia significativa en el tratamiento D y F. En donde nos indica que a mayor de enzima menor tiempo de hidrólisis y el pH empieza a incrementarse con mayor rapidez y tarda mayor tiempo con una ligera variación del pH.

Según los análisis microbiológicos que realice al hidrolizado se observó que hubo una carga microbiana de 10 UFC/g de aerobios mesófilos y 300 UFC/g de coliformes totales, con lo que sí existe presencia de aerobios mesófilos y coliformes totales, pero no superan los límites máximos permisibles según el Boletín Real del Estado español (BOE).

4.1. RECOMENDACIONES

En la obtención de un hidrolizado se debe determinar el nitrógeno total ya que depende para poder determinar las proteínas utilizando el factor 6.25

En estos tipos de hidrolizados se recomienda determinar el % proteico que tiene el hidrolizado y la viscosidad del mismo.

Se debe determinar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas que cuenta el hidrolizado para saber si es inocuo y de alta calidad nutricional.

Se recomienda que para hidrolizar carne de vieja azul hay que adicionar 2 ml de enzimas obteniendo una concentración cercana al 100% de hidrolizado.

5. BIBLIOGRAFIA

1. B.O.E. (01 de 2008). Obtenido de RECOPIACIÓN DE NORMAS MICROBIOLÓGICAS:
<http://www.eurocarne.com/daal?a1=informes&a2=normas-microbiologicas.pdf>
2. Baudi, S. (2006). Química de los alimentos. En Q. Mricarmen, *Enzimas* (págs. 301-338). Mexico: koriza.S.A de C.V.
3. Benitez, R. (2008). *Hidrolizados de proteína:*. Recuperado el 31 de 10 de 2014, de <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v42n2/v42n2a08.pdf>
4. Benítez, R. (2008). *Hidrolizados de proteína*. Recuperado el 26 de 08 de 2014, de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53542208>
5. Birdsall, T. (2002). *ENZIMAS PROTEOLÍTICAS*. Recuperado el 26 de 08 de 2014, de <http://oncocomplementos.blogspot.com/2012/10/enzimas-proteoliticas.html>
6. Boqué, R. (2011). *EL ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA)*. Obtenido de Grupo de Quimiometría y Cualimetría:
<http://www.quimica.urv.es/quimio/general/anovacast.pdf>
7. CABALLERO Lucia. (15 de 05 de 2011). *Hidrólisis de las proteínas*. Recuperado el 27 de 11 de 2014, de <https://es.scribd.com/doc/55483159/Hidrolisis-de-las-proteinas>
8. Cruz, A. (28 de 09 de 2014). *AEQUIDENS RIVULATUS*. Obtenido de <http://animalesmagicosdelmar.blogspot.com/2014/09/melanochromis-cyaneorhabdos.html>
9. *DISEÑO NATURAL ACUARIO*. (29 de enero de 2014). Recuperado el 27 de octubre de 2014, de ECOSISTEMAS:
<http://blog.dnatecosistemas.es/category/dnatecosistemas/peces-agua-dulce/ciclididos-americanos/>

10. FERNANDEZ Juan M. (s.f.). *Hidrolisis de las sales*. Recuperado el 27 de 10 de 2014, de Aulas Virtuales del IES Jorge Manrique: <http://aulas.iesjorgemanrique.com/calculus/quimica/practicaslaboratorio/saleshid/saleshid.html>
11. Fernandez, J. (2014). *Hidrolisis de las sales*. Recuperado el 27 de 10 de 2014, de Aulas Virtuales del IES Jorge Manrique: <http://aulas.iesjorgemanrique.com/calculus/quimica/practicaslaboratorio/saleshid/saleshid.html>
12. González, E. (2010). *Prueba de Tukey*. Obtenido de http://www.mag.go.cr/rev_meso/v21n02_349.pdf
13. Google Earth. (2015). Obtenido de <https://www.google.com/earth/explore/products/desktop.html>
14. Granotec. (2013). *GRANOZYME ACC*.
15. Guadix. (2000). *métodos de control en la hidrolisis de proteína*. Recuperado el 30 de 04 de 2015, de <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/183.pdf>
16. HACH COMPANY. (2005). Determinacion de Nitrogeno Total. *Manual de espectrofotometro*.
17. INEN 0222. (s.f.). *DETERMINACION DEL CONTENIDO DE HUMEDAD*. Recuperado el 12 de 11 de 2014, de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0222.1978.pdf>
18. INEN 0300. (s.f.). *DETERMINACIÓN DE LA GRASA*. Recuperado el 12 de 11 de 2014, de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0300.1980.pdf>
19. INEN 0465. (s.f.). *determinacion de proteína* . Recuperado el 12 de 11 de 2014, de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0465.1980.pdf>
20. INEN 0467. (s.f.). *DETERMINACION DE LAS CENIZAS* . Recuperado el 12 de 11 de 2014, de <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0467.1981.pdf>
21. INEN. (2012). Pescado fresco, refrigerado y congelado. Requisitos. *NTE INEN 0183*.

22. LA FAO. (2013). Obtenido de CALIDAD DE METODOS ANALITICOS:
<http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/AH833S15.htm>
23. MAE. (2013). Proyecto de Sostenibilidad Financiera (PSF) para el Sistema Nacional de Áreas Protegidas - SNAP. *Ministerio de Ambiente del Ecuador* , Pàg. 7.
24. Mendes, A. (07 de 05 de 2010). Recuperado el 27 de 05 de 2015, de Hidrólisis de las sales: <http://quimica.laguia2000.com/reacciones-quimicas/hidrolisis-de-las-sales>
25. Mendoza, R. R. (2004). *Aspectos bioecológicos de Aequidens rivulatus*. Recuperado el 26 de 04 de 2015, de mexico.com/articulos/Aequidensrivulatus.pdf fuente de pdf aequides rivulatus
26. Ministerial N° 615-SA/DM. (2003). *MINSA/DIGESA-V.01* . Obtenido de NORMA SANITARIA QUE ESTABLECE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS : http://www.digesa.sld.pe/norma_consulta/RM%20615-2003MINSAs.pdf
27. Monica. (15 de 10 de 2012). *Hidrolisis Enzimatica*. Recuperado el 26 de 08 de 2014, de <http://www.buenastareas.com/ensayos/Hidrolisis-Enzimatica/6090486.html>
28. Navarra. (2013). *Oxígeno disuelto*. Obtenido de http://www.navarra.es/home_es/Temas/Medio+Ambiente/Agua/Documentacion/Parametros/OxigenoDisuelto.htm
29. Obando, R. (2010). *Caracterización de algunas materias*. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/15898/1/10631-20672-1-PB.pdf>
30. Peña, G. R. (09 de 06 de 2010). *VALOR NUTRITIVO DEL PESCADO*. Recuperado el 07 de 11 de 2014, de <http://es.scribd.com/doc/24965091/Valor-Nutritivo-Pescado>
31. PMRC. (2006). *PROGRAMA DE MANEJO DE RECURSOS COSTEROS*. Obtenido de _____ de _____

http://simce.ambiente.gob.ec/sites/default/files/documentos/belen/3.b.%20Estudio_de_Factibilidad-_Tembladera.pdf

32. Salazar, P. (25 de 06 de 2012). *Efecto del pH* . Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1794-44492012000200004&script=sci_arttext

ANEXOS

Anexo 1: Obtención del hidrolizado

Materia prima



Fuente: Ortega 2015

Peso de la materia prima y activación de la enzima



Fuente: Ortega 2015

Activación en la estufa



Fuente: Ortega 2015

Hidrolizado



Fuente: Ortega 2015

Anexo 2: Determinación de humedad



Fuente: Ortega 2015

Peso de la húmeda



Fuente: Ortega 2015

Anexo 3: Determinación de ceniza



Fuente: Ortega 2015



Fuente: Ortega 2014

Anexo 4: Determinación de proteínas



Fuente: ortega 2015

Anexo 5: Determinación de grasa



Fuente: Ortega 2015

Concentracion de grasas



Fuente: Ortega 2015

Anexo 6: Determinación de pH



Fuente: Ortega 2015

Anexo 7: Viscosidad



Fuente: Ortega 2015

Anexo 8: Análisis microbiológicos



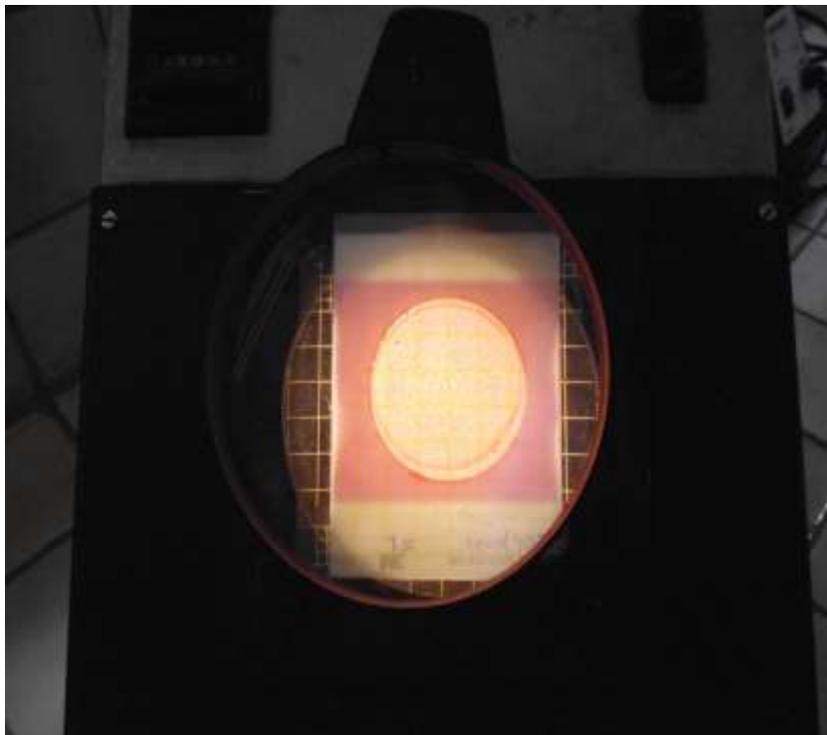
Fuente: Ortega 2015

Estufa



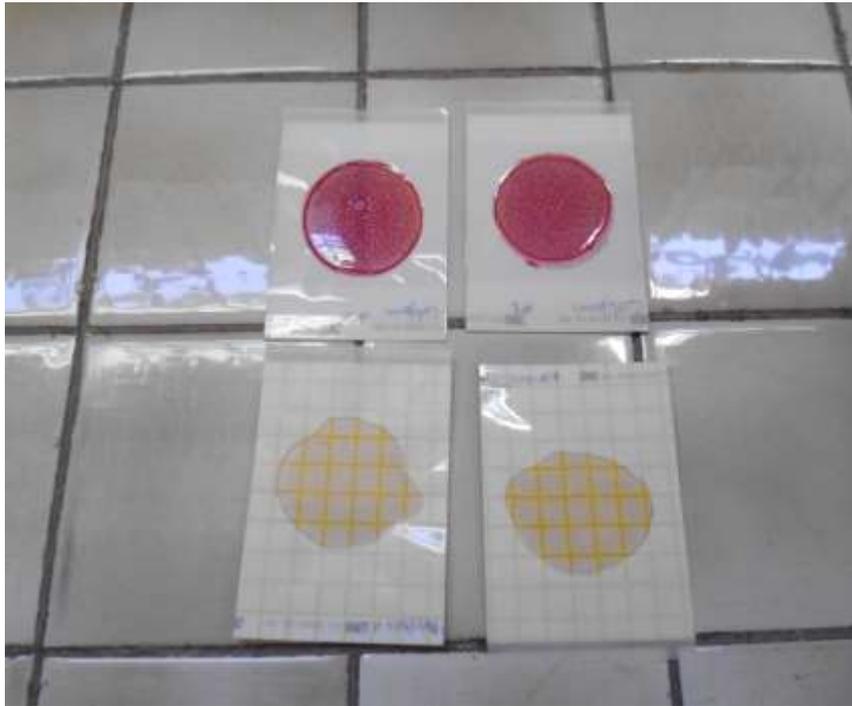
Fuente: Ortega 2015

Contador de colonia



Fuente: Ortega 2015

Petri fil



Fuente: ortega 2015