








Optimization of Perico (*Coryphaena hippurus*) gelatin hydrolysis process to obtain bioactive peptides by response surface modelling

Hurtado Saldaña, Diana¹, Marquina Sánchez, Viviana¹, Ñontol Ascate, Angel¹ Ruiz Córdova, Josemaria¹ Javier Sánchez, Jhan¹ Carlos García, Arliss¹ and Silva-Chuquipoma, Diego Honorato¹

¹ Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Privada del Norte (UPN), Trujillo, Perú.
N00256877@upn.pe, N00236753@upn.pe, N00235088@upn.pe, N00246489@upn.pe, N00096459@upn.pe,
N00180374@upn.pe, diego.silva@upn.pe, diego.silva@upn.edu.pe

Abstract– Enzymatic hydrolysis was applied following the response surface model with the objective of maximizing the degree of hydrolysis and the antioxidant activity of gelatin hydrolysates from parakeet (*Coryphaena hippurus*) skin. Two pretreatments were carried out which served to condition the samples prior to obtaining the gelatin. The alkaline endoprotease type enzyme Corolase 8000 (AB Enzymes) was used for gelatin extraction. In addition, the same process was optimized by maximizing variables such as time X1 (120, 240 and 360 min) and enzyme percentage Y2 (3.60, 7.20 and 14.50% w/w). The degree of hydrolysis was determined by the macro-Kjeldahl procedure, as well as the percentage of free amino groups, following the proposed equations, and the antioxidant activity was analyzed by the ABTS radical scavenging ability method. Finally, it was evidenced that the highest percentage of enzyme: substrate concentration (14.50%) at a time of 6 hours showed the maximum value of percentage of degree of hydrolysis (%DH) and for the antioxidant activity there was inhibition of the radical up to a maximum of 49.49 (μM eq. Trolox/g d.w.) at the end of 6 hours, showing a significant difference with respect to the control sample (34.58 μM eq. Trolox/g d.w.). Therefore, it was concluded that the enzymatic hydrolysis parameters allowed enhancing the biological characteristics of fish gelatin.

Keywords: fish jelly, Antioxidant activity, Degree of hydrolysis, enzymatic hydrolysis

Digital Object Identifier: (only for full papers, inserted by LACCEI).
ISSN, ISBN: (to be inserted by LACCEI).
DO NOT REMOVE

Optimization of Perico (*Coryphaena hippurus*) gelatin hydrolysis process to obtain bioactive peptides by response surface modelling

Hurtado Saldaña, Diana¹, Marquina Sánchez, Viviana¹, Ñontol Ascate, Angel¹, Ruiz Córdova, Josemaría¹, Javier Sánchez, Jhan¹, Carlos García, Arliss¹ and Silva-Chuquipoma, Diego Honorato¹

¹ Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Privada del Norte (UPN), Trujillo, Perú.
N00256877@upn.pe, N00236753@upn.pe, N00235088@upn.pe, N00246489@upn.pe, N00096459@upn.pe,
N00180374@upn.pe, diego.silva@upn.pe, diego.silva@upn.edu.pe

Resumen- Se aplicó hidrólisis enzimática siguiendo el modelo de superficie de respuesta con el objetivo de maximizar el grado de hidrólisis y la actividad antioxidante de hidrolizados de gelatina de piel de periquito (*Coryphaena hippurus*). Se realizaron dos pretratamientos que sirvieron para acondicionar las muestras antes de la obtención de la gelatina. Para la extracción de gelatina se utilizó la enzima alcalina de tipo endoproteasa Corolase 8000 (AB Enzymes). Además, se optimizó el mismo proceso maximizando variables como el tiempo X1 (120, 240 y 360 min) y el porcentaje de enzima Y2 (3,60, 7,20 y 14,50% p/p). El grado de hidrólisis se determinó por el procedimiento macro-Kjeldahl, así como el porcentaje de grupos amino libres, siguiendo las ecuaciones propuestas, y la actividad antioxidante se analizó por el método de la capacidad de barrido de radicales ABTS. Finalmente, se evidenció que el mayor porcentaje de concentración enzima: sustrato (14,50%) a un tiempo de 6 horas mostró el máximo valor de porcentaje de grado de hidrólisis (%DH) y para la actividad antioxidante se observó inhibición del radical hasta un máximo de 49,49 ($\mu\text{M eq. Trolox/g p.d.}$) al cabo de 6 horas, mostrando una diferencia significativa con respecto a la muestra control (34,58 $\mu\text{M eq. Trolox/g p.d.}$). Por lo tanto, se concluyó que los parámetros de hidrólisis enzimática permitieron mejorar las características biológicas de la gelatina de pescado.

Palabras clave: gelatina de pescado, actividad antioxidante, grado de hidrólisis, hidrólisis enzimática

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se ha visto un crecimiento significativo de la producción pesquera a nivel mundial [1], superando cifras de 171 millones de toneladas aproximadamente en los últimos años [2]. Este constante crecimiento en el procesamiento de pescado se encuentra relacionado con el aumento de volúmenes de residuos, debido a que se genera alrededor de 350 a 600 kg de residuos sólidos por tonelada de pescado, en las cuales se destacan las pieles, vísceras, huesos, espinas, entre otros [3][4]. Estos subproductos comúnmente son desechados de manera inadecuada, causando un impacto medioambiental negativo, más aún, cuando se realiza la pesca y comercialización de forma artesanal, debido a que, por falta de conocimiento o interés simplemente suelen tirarlos en basureros, estos hechos suelen notarse en los países en desarrollo.

En el Perú, estos residuos vertidos en basurales representan un aproximado del 60% dentro del procesamiento pesquero, causando la propagación de roedores y contaminación [5], además de la pérdida de un componente de interés como el colágeno encontrándose en mayor proporción en las pieles de pescado (70%) [6], de las cuales son considerados como nuevas fuentes para la obtención de

gelatina [7]. Sin embargo, la gelatina obtenida de la piel de pescado presenta un valor nutricional muy bajo debido a la falta de aminoácidos esenciales [8]. Por tal razón, estudios preliminares realizan una hidrólisis enzimática como alternativa para potenciar el aprovechamiento proteico mejorando la calidad nutricional del sustrato y garantizar la liberación de péptidos bioactivos [1].

La extracción de péptidos a partir de desechos de pescado es un proceso utilizado para obtener compuestos bioactivos con propiedades funcionales y nutricionales. Existen numerosas investigaciones que detallan cada una de las implicancias de este estudio, la cual consta de una serie de pasos que van desde la preparación de pieles de pescado hasta el análisis de las propiedades biológicas del producto obtenido. Primero, se debe recolectar y preparar las pieles de pescado, las cuales pueden provenir de diferentes especies, ejemplares como *Coryphaena hippurus* o perico como se le conoce comúnmente. Sin embargo, se han reportado trabajos nacionales en los que se ha utilizado desechos de pescados como pieles de *Sarda chiliensis* o bonito [9], y *Engraulis ringens* o anchoveta. Los desechos de pescado suelen ser un subproducto de la industria de procesamiento de pescado y, por lo tanto, suelen estar fácilmente disponibles. Sin embargo, para su uso se sugiere un pretratamiento con solución ácida, debido a que es el medio idóneo para ser aplicado en subproductos de pescado para la extracción de gelatina. Para ello, en algunas investigaciones se hizo uso de compuestos como el Cloruro de Sodio, en las que las pieles de corvina descongeladas fueron puestas en una solución de NaCl 0.75, con una relación de 1:6 (p/v) por 10 min a 4°C [10]. También, se recomienda el uso de NaOH a 0.1 M para el remojo de pieles de carpa, el cual debe complementarse con agitación periódica de cada 3h, hasta alcanzar un pH de 7. No obstante, se definió a esta etapa del proceso como un tratamiento básico, más no un pretratamiento [11]. Luego, la literatura científica indica la siguiente etapa del proceso a la extracción de péptidos y gelatina luego de haber aplicado los pretratamientos respectivos.

A pesar de las diversas propiedades funcionales, nutricionales y benéficas para la salud, entre ellas antioxidantes reportados para hidrolizados de gelatina, estas se ven grandemente afectadas por las condiciones de hidrólisis como la especificidad de la enzima, la relación sustrato-enzima, el grado de hidrólisis, la composición de aminoácidos, entre otros [12]. Por lo que la optimización de estos

parámetros como el tiempo y la cantidad de enzima-sustrato afecta a las propiedades es de vital importancia para definir una potencial aplicación de los hidrolizados proteicos. En base a esto, la importancia de este estudio radica a que hoy en día se está buscando aprovechar y revalorizar en gran manera los residuos, en este caso las pieles de pescado de perico (*Coryphaena hippurus*). A partir de este subproducto hecho gelatina se tendrá un hidrolizado a partir de la enzima Corolase 8000 a fin de fortalecer sus propiedades biológicas para futuras aplicaciones en la industria alimentaria, el área farmacéutica, cosmética entre otros.

La presente investigación busca optimizar el proceso de hidrólisis utilizando el modelo de superficie respuesta con la finalidad de maximizar el grado de hidrólisis y la actividad antioxidante de hidrolizados de gelatina de piel de perico (*Coryphaena hippurus*), así como la extracción de gelatina de pescado perico (*Coryphaena hippurus*) y la determinación del grado en hidrolizados de gelatina de pieles de pescado perico (*Coryphaena hippurus*).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Aislamiento de gelatina

Se aisló la gelatina de piel de *Coryphaena hippurus* "Perico" siguiendo el protocolo desarrollado en el Laboratorio de Procesos Agroindustriales de la Universidad Nacional de Trujillo, con algunas modificaciones [13], tal y como se detalla en la Figura 1.

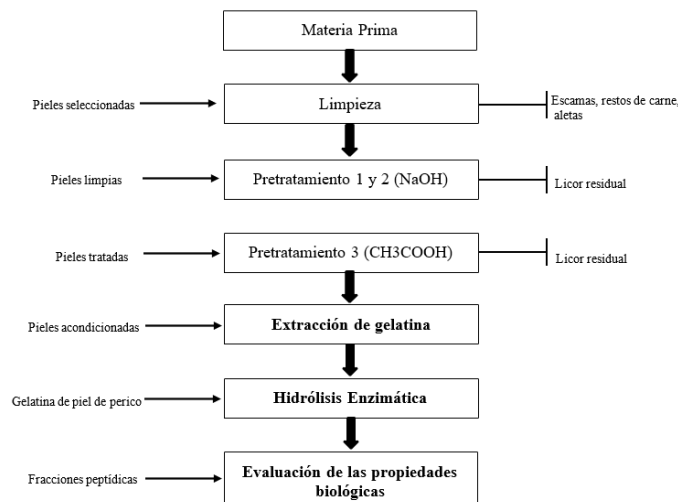


Fig. 1 Flujograma del proceso de obtención de hidrolizados de gelatina de piel de perico *Coryphaena hippurus*.

B. Hidrólisis enzimática

La gelatina extraída fue sometida a una etapa de hidrólisis usando una enzima del tipo endoproteasa alcalina Corolase 8000 (AB Enzymes) y se tomó como referencia el protocolo

preestablecido con algunas modificaciones [14]. Se realizó una suspensión al 2.5% w/v (gelatina: enzima) que fue levemente preparada en buffer TRISS (50 ml). Asimismo, se ajustó el pH de la suspensión a 8 con 1 M de NaOH. Tres diferentes concentraciones de enzima fueron añadidas a la mezcla (3,60; 7,20 y 14,50% w/w) y fueron colocadas en un agitador magnético (AREX DIGITAL PRO) a tres diferentes tiempos 120, 240 y 360 min a una temperatura controlada de 60 °C. Las muestras de los hidrolizados fueron inspeccionadas cada 20 min y el proceso será finalizado por inactivación de la enzima a 90 °C por 15 min. El sobrenadante fue recuperado por una centrifugación a 6000 g-1 x 15 min a 4 °C, empleando una centrifuga (CR2000, Centurion Scientific) que posteriormente, fue extraído por pipetas Pasteur y depositadas en tubos de ensayo Falcon de 50 ml. Cabe resaltar que, se realizaron 13 tratamientos para los parámetros de hidrólisis enzimática, tal como se presenta en la Tabla 1.

TABLA I
DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE GELATINA DE PIEL DE PERICO (CORYPHAENA HIPPURUS)

C. Optimización del proceso de hidrólisis

Tratamientos	Tiempo (h)	pH	Concentración de enzima: sustrato (%w/w)	Enzima - Sustrato ul
T1-2-62.5	2	8	3.60	62.5
T2-2-125	2	8	7.20	125
T3-2-250	2	8	14.50	250
T4-4-62.5	4	8	3.60	62.5
T5-4-125	4	8	7.20	125
T6-4-125	4	8	7.20	125
T7-4-125	4	8	7.20	125
T8-4-125	4	8	7.20	125
T9-4-125	4	8	7.20	125
T10-4-250	4	8	14.50	250
T11-6-62.5	6	8	3.60	62.5
T12-6-125	6	8	7.20	125
T13-6-250	6	8	14.50	250

Se llevó a cabo la implementación de optimización del proceso de hidrólisis mediante la metodología de superficie respuesta (RSM), la cual se enfocó en maximizar las variables respuesta; grado de hidrólisis (Y1) y actividad antioxidante (Y2). Un diseño central rotatable de dos variables independientes con tres niveles para cada variable, tiempo X1 (120, 240 y 360 min) y porcentaje de enzima X2 (3,60%, 7,20% y 14,50%), fueron investigados respectivamente. Los experimentos fueron realizados de manera aleatorizada, para lograr maximizar los efectos de la variabilidad no planificada.

D. Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis (DH) en las muestras de hidrolizados de gelatina de piel de perico fue revisado usando el método de titulación formaldehído adaptado por un estudio previo con algunas modificaciones [15]. Se extrajo la cantidad de 15 ml de las muestras de hidrolizados de gelatina de pescado y se ajustó el pH a 7,0 con una solución de HCL. A ello se incluyó un volumen de 1 mL de formaldehído (37%, v/v) y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min para su

reacción. Luego la solución se aumentó el pH a 8,5 empleando NaOH 0,05 M. El contenido de TN se determinó a través del procedimiento macro-Kjeldahl, en el cual se emplearon las ecuaciones (1) y (2) para calcular AN (%) y DH (%).

$$\frac{V \times M \times 14.007 \times 100}{W \times 1000} = \% \text{ free amino groups (AN\%)} \quad (1)$$

$$\frac{\text{FAG} \times 100}{\% \text{ TN}} = \text{Degree of hydrolysis (DH\%)} \quad (2)$$

Donde, V (mL) es el volumen y M (0,05 M) la molaridad de NaOH utilizados para la titulación de formaldehído y W es el peso del hidrolizado (g). Cabe resaltar que, el Nitrógeno total en la muestra utilizada (TN) = % N (% de proteínas dividido por 6,25).

E. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las fracciones obtenidas fue analizada respectivamente, a través del método de medición de la habilidad secuestrante del radical ABTS (Sal de ácido 2,2-acino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) diamonio, tomando como referencia protocolos previamente establecidos más algunas modificaciones [16][17].

E.1. Actividad antioxidante por el método de ABTS

EL valor de ABTS estuvo determinado para los tratamientos establecidos a partir de una solución stock del radical ABTS (7 mM) disuelta en persulfato de potasio (2.45 mM) previamente preparada al menos 16 horas antes del proceso y luego diluida a un valor de absorbancia entre 0.8-0.9 a una longitud de onda de 734 nm. La muestra de hidrolizado fue adecuadamente diluida para luego mezclada con la solución de ABTS e incubada en oscuridad a 30 °C por 10 min y finalmente la reducción de la absorbancia fue grabada en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Orion 8000 Aquamate) y comparado con respecto al valor de inicial de la solución de ABTS. Se llevó a cabo el cálculo de la actividad antioxidante, usando los datos de la ecuación de la recta de la curva de calibración y expresada como equivalentes del patrón de trolox.

F. Análisis Estadístico

Para el diseño y optimización de producción de hidrolisis de la gelatina, se empleó el método de superficie de respuesta (RSM). Todos los resultados estadísticos se analizaron con un nivel de confianza del 95 % (valor de p <0,05).

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A. Aislamiento de gelatina

El valor de DH (%) de los tratamientos con tres repeticiones de gelatina de piel de pescado sometidos a condiciones de hidrolisis enzimática, mostraron los siguientes resultados en la Tabla 2.

TABLA II
GRADO DE HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE GELATINA DE PIEL DE PERICO (CORYPHAENA HIPPURUS)

Tratamientos	Ratio Enzima: sustrato (w/w)	Tiempo (h)	GRADO DE HIDRÓLISIS			%DH
			R1	R2	R3	
T1	3.60%	2	29.05%	31.27%	30.29%	30.20%
T4	3.60%	4	70.88%	74.47%	70.57%	71.97%
T11	3.60%	6	82.94%	79.47%	92.33%	84.91%
T2	7.20%	2	42.34%	37.74%	33.54%	37.87%
T5, T6, T7, T8 Y T9	7.20%	4	90.43%	87.93%	90.22%	89.53%
T12	7.20%	6	94.12%	98.76%	97.26%	96.71%
T3	14.50%	2	48.37%	44.01%	47.91%	46.76%
T10	14.50%	4	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%
T13	14.50%	6	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

El porcentaje de grado de hidrolisis para los tratamientos T1, T4 y T11 a condiciones de enzima: sustrato (w/w) de 3.60% durante el tiempo de 2, 4 y 6 horas, presentaron cifras del 30.20, 71.97 y 84.1% respectivamente, en el cual se determina que existió un incremento significativo del %DH en el transcurso del tiempo (h). Estudios similares aplicados a la piel de bonito (*Sarda chiliensis chiliensis*), emplearon una relación enzima: sustrato 1/35 (w:w) presentando al cabo de 2 y 3 horas un %DH del 20,99% y 33,65% respectivamente [18].

De igual manera, para la piel del pez cabeza de serpiente (*Channa striata*), en una relación de enzima: sustrato al 6% manifestaron que se obtuvo un hidrolizado en el tiempo máximo de 6 horas con un %DH del 79,8% [20]. En comparación, se muestra resultados similares a otros estudios, debido a que se tuvieron similares condiciones de enzimólisis. Sin embargo, otros estudios resaltan que al tener un mayor tiempo al de 6 horas con una menor concentración de enzima: sustrato (1-2%) se llega a obtener cifras altas de %DH dependiendo del tipo de materia prima utilizado [19].

Asimismo, se presenta los resultados de los tratamientos (T2, T5, T6, T7, T8 y T9) con respecto al ratio de enzima: sustrato (w/w) al 7.20% en el cual muestra cifras en aumento progresivo con el transcurso del tiempo, teniéndose para 2 horas un 37.87%, para 4 horas un 89.53% y para 6 horas 96.71%. Además, se determinó que al incrementar esta relación enzima: sustrato (w/w) al 14.50% existe un hidrolizado al máximo mostrando un %DH del 100% al pasar las 4 horas.

En la Figura 2 se muestra una comparativa del porcentaje de grado de hidrólisis (%DH) con respecto al tiempo empleado (2, 4 y 6 h), tomando en cuenta la ratio enzima: sustrato de los tratamientos.

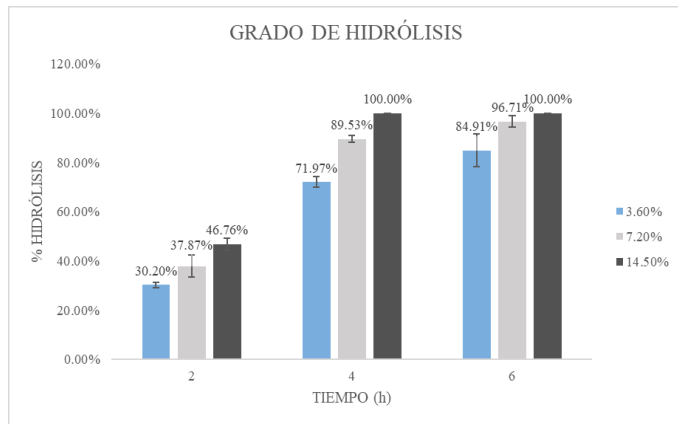


Fig. 2 Porcentaje de grado de hidrólisis (%DH) obtenido para cada tratamiento respecto al tiempo

De lo anterior se observa que, a medida que incremente la concentración enzima: sustrato y el tiempo (h), existe un mayor efecto para la obtención de gelatina hidrolizada determinándose que al cabo de las 4 y 6 horas con el mayor porcentaje de concentración enzima: sustrato (14.50%) se tuvo un rendimiento del 100% de hidrólisis enzimática en la gelatina de piel de perico en comparación con el menor tiempo (2 h). Cabe resaltar que, al pasar las 4 horas se presentó un porcentaje de grado de hidrólisis constante tal como se muestra en la figura 3.

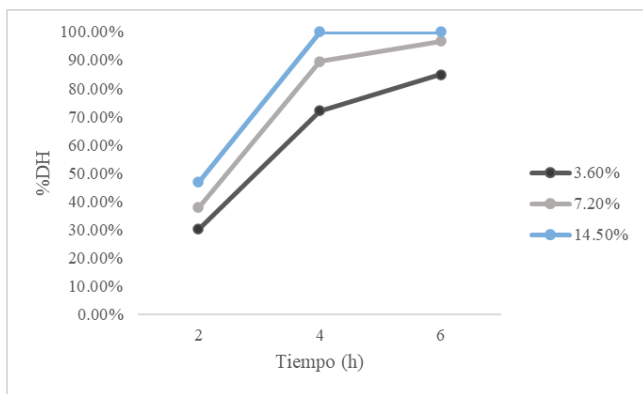


Fig. 3 Porcentaje de grado de hidrólisis (%DH) respecto al tiempo

Por otro lado, en la figura 4 se presentó el modelo de superficie de respuesta para el %DH, en el cual se tuvo que el 14% de enzima (w/w) a un tiempo de 6 horas demostró el valor máximo de porcentaje de grado de hidrólisis (%DH).

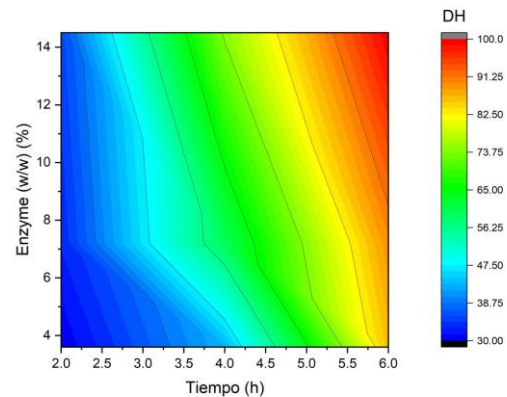


Fig. 4 Modelo de superficie de respuesta del porcentaje de grado de hidrólisis (%DH)

B. Actividad Antioxidante

Los valores de actividad antioxidante por el método de ABTS de los tratamientos con dos repeticiones de hidrolizados de gelatina de piel de pescado mostraron los siguientes resultados en la Tabla 3.

TABLA III
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE HIDROLIZADOS DE GELATINA DE PIEL DE PESCADO PERICO (CORYPHAENA HIPPIRUS)

Tratamiento	Actividad antioxidante ABTS ($\mu\text{M eq. Trolox/g d.w.}$)		Actividad Antioxidante ($\mu\text{M eq. Trolox/g d.w.}$)
	R1	R2	
T1	34.49	34.58	34.54
T2	35.08	35.24	35.16
T3	35.41	35.91	35.66
T4	37.00	37.58	37.29
T5, T6, T7, T8 Y T9	40.84	40.96	40.90
T10	43.85	44.18	44.02
T11	46.27	46.69	46.48
T12	47.1	47.35	47.23
T13	49.78	49.19	49.49
GELATINA (MC)	34.49	34.66	34.58

Los resultados de los valores de los tratamientos a diferencia de la muestra control, mostraron que existió inhibición del radical permitiendo lograr una actividad antioxidante significativa hasta un máximo 49.49 ($\mu\text{M eq. Trolox/g d.w.}$) al cabo de 6 horas. En un estudio similar aplicado en pieles de Baula (*Chitala ornata*) demostraron que el total de actividad antioxidante fue de 35.59 ($\mu\text{M eq. Trolox/g d.w.}$) al cabo de 5 horas con ratio de enzima:sustrato 80 U/g de proteína. En este contexto, las concentraciones de enzima permiten potenciar las características biológicas de la gelatina de pescado [21].

Asimismo, en la Figura 5 se presenta la actividad antioxidante con respecto a los tratamientos y la gelatina (muestra control). En el cual, se determina que existe diferencia por parte de los tratamientos (T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12 y T13) con respecto a la gelatina sin hidrolizar. Cabe resaltar que la gelatina de piel de pescado sin hidrolizar presenta de por sí aminoácidos esenciales en baja cantidad [8], por ello presenta una cantidad de 34.58 μM eq. Trolox/g d.w.) de actividad antioxidante.

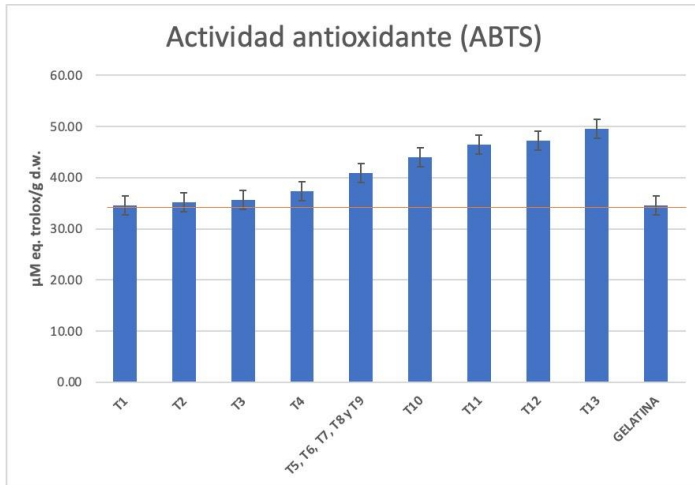


Fig. 5 Actividad antioxidante con respecto a cada tratamiento

Por otro lado, en la figura 6 se presentó el modelo de superficie de respuesta para la actividad antioxidante por el método ABTS, en el cual se tuvo que al 14% de enzima (w/w) y a un tiempo de 6 horas demostró el valor máximo de actividad antioxidante.

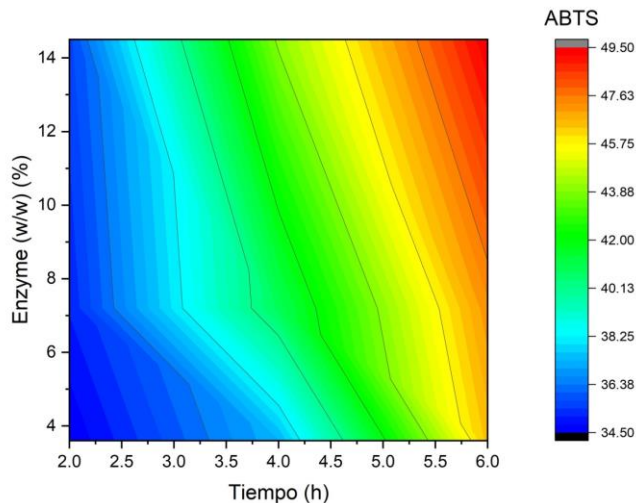


Fig. 6 Modelo de superficie de respuesta de actividad antioxidante por el método ABTS.

IV. CONCLUSIONES

Se identificó el grado de hidrólisis y la actividad antioxidante de hidrolizados de gelatina de piel de perico (*Coryphaena hippurus*), obteniéndose el 100% de hidrólisis enzimática pasado las 4 horas con una relación de enzima: sustrato del 14% (w/w) siendo este el punto óptimo del proceso. Cabe resaltar que, transcurrido 6 horas y aplicando la misma proporción de enzima: sustrato se obtuvo la mayor cantidad de actividad antioxidante (49.49 μM eq. Trolox/g d.w.)

Ante ello, es válido decir que los hidrolizados de piel de perico (*Coryphaena hippurus*), son una fuente potencial de péptidos bioactivos debido a la notable capacidad antioxidante que poseen, permitiendo ser empleada en el desarrollo de productos funcionales dentro de la industria alimentaria, nutracéuticas, cosméticas, entre otros. Asimismo, de ser de gran interés para empresas procesadoras de pescados, brindando la oportunidad de dar un valor agregado a un subproducto como es la piel de pescado.

Por último, al determinarse la óptima relación entre el tiempo de hidrolizado y la concentración de enzima aplicado, los resultados muestran un rendimiento muy elevado, es decir se debió utilizar muy bajas concentraciones de enzima, por lo que se establece que a más tiempo de hidrolizado mejor interacción de la enzima. Sin embargo, a nivel industrial se debe considerar los costos, energía, tiempo y las concentraciones de enzima, ya que este suele tener ventajas y desventajas, por lo que se debe llevar a una evaluación para determinar su beneficio o no para la industria que desee aplicar. Por ello, se sugiere evaluar las propiedades fisicoquímicas del producto hidrolizado para la aplicación de procesos industrializados.

AGRADECIMIENTO

Se agradece la colaboración de la Universidad Nacional de Trujillo por la prestación de las instalaciones para el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

- [1] Sierra, L., & Zapata, J. (2021). Optimization of enzymatic hydrolysis of red tilapia scales (*Oreochromis sp.*) to obtain bioactive peptides. *Biotechnology Reports*, 30, 1-10.
- [2] Lopes, I., Lalander, C., Vidotti, R. & Vinnerås, B. (2020). Using *Hermetia illucens* larvae to process biowaste from aquaculture production. *Journal of Cleaner Production*, 251(4).
- [3] Lopes, I., Braos, L., da Cruz, M. & Vidotti, R. (2021). Valorization of animal waste from aquaculture through composting: Nutrient recovery and nitrogen mineralization. *Aquaculture*, 531.
- [4] Nikoo, M., Benjakul, S., Yasemi, M., Ahmad, H., Xu, X. (2019). Hydrolysates from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing by-product with different pretreatments: Antioxidant activity and their effect on lipid and protein oxidation of raw fish emulsion. *LWT -Food Science and Technology*, 108, 120-128.
- [5] Belli, F., Castilla, A., De La Cruz, H., Yauri, P. & Argota, G. (2023). Diseño de tratamiento sostenible para eviscerados de residuos hidrobiológicos del mercado modelo de Ica, Perú. *Biotempo*, 20(1), 85–89.
- [6] Zhang, Y., Duan, X., & Zhuang, Y. (2012). Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. *Peptides*, 38(1), 13-21.
- [7] Abdollahi, M. & Undeland, I. (2019). Physicochemical and gel-forming properties of protein isolated from salmon, cod and herring by-products using the pH-shift method. *LWT*. 101, 678–684.
- [8] Zhang, Y., Tu, D., Shen, Q. & Dai, Z. (2019). Fish scale valorization by hydrothermal pretreatment followed by enzymatic hydrolysis for gelatin hydrolysate production. *Molecules*, 24(16), 2998.
- [9] Tejada, E., Fernández, Y., & Salazar, M. (2020). Actividad antioxidante y antimicrobiana del hidrolizado de gelatina de pieles de *Sarda chiliensis chiliensis* “bonito”. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 86(3), 207-218.
- [10] Kumar, D., Chandra, M., Elavarasan, K., & Shamasundar, B. (2017). Structural properties of gelatin extracted from croaker fish (*Johnius sp*) skin waste. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 2612-2625.
- [11] Tkaczewska, J., Bukowski, M. & Mak, P. (2019). Identification of Antioxidant Peptides in Enzymatic Hydrolysates of Carp (*Cyprinus Carpio*) Skin Gelatin. *Molecules*, 24(1), 97.
- [12] You, L., Regenstein, J. M., & Liu, R. H. (2010). Optimization of hydrolysis conditions for the production of antioxidant peptides from fish gelatin using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 75 (6), 582-587.
- [13] Díaz, P., Flores, E., González, A., Pepczynska, M., Quero, F. & Enrione, J. (2017). Influence of extraction variables on the structure and physical properties of salmon gelatin. *Food Hydrocoll*, 71, 118–128.
- [14] Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., & Gómez-Guillen, M.C. 2009. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114, 976-983.
- [15] Noman, A., Xu, Y., W.Q. Al-Bukhaiti, S.M. Abed, A.H. Ali, A.H. Ramadhan, et al. (2018). Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. *Process Biochemistry*, 67,19-28.
- [16] Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70.76.
- [17] Re, R. Pellegrini, N., Proteggente, A. Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- [18] Tejada, E., Fernández, Y., & Salazar, M. (2020). Actividad antioxidante y antimicrobiana del hidrolizado de gelatina de pieles de *Sarda chiliensis chiliensis* “bonito”. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 86(3), 207-218. <http://dx.doi.org/10.37761/rsqp.v86i3.295>
- [19] Korkmaz, K. & Tokur, B. (2022). Optimization of hydrolysis conditions for the production of protein hydrolysates from fish wastes using response surface methodology. *Food Bioscience*, (45).
- [20] Agustin, V., Prima, M. M. P., & Husni, A. (2023). Impact of Enzymatic Hydrolysis on Antioxidant Activity of Snakehead Fish (*Channa striata*) Head Protein Hydrolysate. *Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan*, 15(1), 44-56. :10.20473/jipk.v15i1.38391
- [21] Vo, T., Duong K., Nguyen A., Vo B., Tran, M., Tran H., Nguyen T., Lam H., Nguyen A. (2023). Featherback (*Chitala ornata*) Skin Protein Hydrolysate: Antioxidant Activity, Amino Acid Composition, Foaming and Emulsifying Properties. *Chemical Engineering Transactions*, 106, 877-882. <https://doi.org/10.3303/CET23106147>