

**Caracterización parcial funcional de los
sólidos recuperados de la centrifugación
complementaria del agua de cola del
procesado de atún**

Roger Josue Narváez Vera

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2019

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Caracterización parcial funcional de los sólidos recuperados de la centrifugación complementaria del agua de cola del procesado de atún

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Roger Josue Narváez Vera

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2019

Caracterización parcial funcional de los sólidos recuperados de la centrifugación complementaria del agua de cola del procesado de atún

Roger Josue Narváez Vera

Resumen. La industria pesquera es generadora de grandes cantidades de subproductos y residuos que comúnmente no son aprovechados de forma adecuada, el agua de cola (AC) entre ellos. La centrifugación complementaria (CC) del AC, es una actividad que permite recuperar material proteico en la fracción sólida con potencial como ingrediente alimentario. El objetivo de este estudio fue cuantificar y caracterizar parcialmente la funcionalidad de Sólidos Sedimentables (SS) recuperados de la CC del AC. Los muestreos se recolectaron en diferentes épocas (noviembre 2017 y febrero 2018). Se realizaron análisis de composición química y propiedades funcionales: Solubilidad en agua Espumante (CE), Estabilidad Espumante (EE), Capacidad Emulsificante (CEm), Índice de Actividad Emulsificante (IAE), Estabilidad Emulsificante (EEm). Los SS presentaron una cantidad de proteína mayor al 50% en su composición base seca. Los valores promedio de solubilidad en agua de las muestras fueron del 17%. La CE fue 12%, sin embargo, uno de los muestreos tuvo mayor EE que el estándar, albúmina de suero bovino. Por otro lado, los SS presentó un valor promedio de 59% de CEm en comparación al estándar, albúmina de huevo. Además, presentaron valores menores IAE frente a una EEm similar del patrón. Los SS presentan potencial para sustituir parcialmente el estándar de emulsificación usado en el estudio, por su alto contenido proteico y características mencionadas con potencialidades de uso en la industria alimentaria en mayonesas y aderezos.

Palabras clave: Biuret, líquido retenido, propiedades emulsificantes, solubilidad en agua.

Abstract. The fishing industry is a generator of a large amount of byproducts and waste that are not commonly used properly, Stickwater (AC) among them. The complementary centrifugation (CC) is an activity that allows recovering protein material; separating the liquid from the solid fraction, with potential as a food ingredient. The objective of this study was to quantify and partially characterize the functionality of Sedimentable Solids (SS) recovered from the CC of the AC. Samples were collected at different times (November 2017 and February 2018). Analyzes of chemical composition and functional properties were performed: Solubility in Foaming Water (EC), Foaming Stability (EE), Emulsifying Capacity (CEm), Emulsifying Activity Index (IAE), Emulsifying Stability (EEm). The SS presented an amount of protein greater than 50% in its dry base composition. The average water solubility values of the samples were 17%. The EC was 12%, however, one of the samples had higher EE than the standard, bovine serum albumin. On the other hand, the SS presented an average value of 59% CEm compared to the standard, egg albumin. In addition, they presented lower IAE values compared to a similar pattern EEm. The SS present potential to partially replace the emulsification standard used in the study. Due to its high protein content and characteristics mentioned with potential for use in the food industry in mayonnaises and dressings.

Key words: Biuret, emulsifying properties, retained liquid, solubility in water.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	iii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
4. CONCLUSIONES.....	15
5. RECOMENDACIONES.....	16
6. LITERATURA CITADA	17
7. ANEXOS.....	21

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Composición química en porcentajes de base seca de los Sólidos Sedimentables recuperados del Agua de Cola de atún.....	7
2. pH de los Sólidos sedimentables provenientes de Agua de Cola de atún.	8
Figuras	Página
1. Diagrama de flujo del procesado de atún	4
2. Solubilidad de albúmina de suero bovino y de los SS	9
3. Capacidad espumante de albúmina de suero bovino y de los SS.....	10
4. Estabilidad espumante de albúmina de suero bovino y de los SS.....	11
5. Capacidad emulsificante de albúmina de huevo y de los SS	12
6. Índice de actividad emulsificante de albúmina de huevo y de los SS.....	13
7. Estabilidad emulsificante de albúmina de huevo y de los SS	14
Anexos	Página
1. Estructura de materiales y equipos usados para evaluación de Capacidad Emulsificante.....	21
2. Equipos de digestión y destilación usados en la técnica de Micro Kjeldahl	21
3. Tubos de ensayo con reactivo de Biuret para realizar curva de estándar en evaluación de Solubilidad en agua.....	22
4. Tubos de recuperación de éter graduados para realizar evaluación de Estabilidad Espumante.	22
5. Cuadro de resultados estadísticos de análisis de Solubilidad.....	23
6. Cuadro de igualdad de varianzas de análisis de Solubilidad.....	23
7. Cuadro de resultados estadísticos de análisis de Capacidad Espumante.....	23
8. Cuadro de igualdad de varianzas de análisis de Capacidad Espumante.....	24
9. Cuadro de resultados estadísticos de análisis de Capacidad Emulsificante.....	24
10. Cuadro de igualdad de varianzas de análisis de Capacidad Emulsificante.....	24

Anexos	Página
11. Cuadro de resultados estadísticos de análisis de Índice de Actividad Emulsificante.....	25
12. Cuadro de igualdad de varianzas de análisis de Índice de Actividad Emulsificante.....	25
13. Cuadro de resultados estadísticos de análisis de Estabilidad Emulsificante.....	25
14. Cuadro de igualdad de varianzas de análisis de Estabilidad Emulsificante.....	26

1. INTRODUCCIÓN

La demanda de productos de origen pesquero para consumo humano crece constantemente. En 2016, más de 151 millones de toneladas, representa el 88% de valor total, de la producción pesquera total fueron destinadas a consumo humano directa (FAO 2018). Actualmente, en México se consumen más de 12 kg de pescado y mariscos *per cápita* al año, valor que continúa en ascenso (CONAPESCA 2016), por lo tanto, la industria trata de cumplir con la demanda del mercado.

El procesamiento de los productos de origen pesquero demanda grandes volúmenes de agua generando, a la vez, grandes volúmenes de efluentes que son vertidos a los diferentes cuerpos de agua, como ríos, lagos, lagunas y bahías, en algunos casos sin tratamiento previo alguno (Vásquez Tafur *et al.* 2013; García-Sifuentes *et al.* 2009). Este tipo de manufactura se caracteriza por generar cantidades considerables de subproductos y desechos, la mayor parte de los cuales pudieran ser procesados para la obtención de co-productos de potencial valor agregado.

La industria pesquera reductora, productora de harina y el aceite de pescado, utilizan especímenes completos de pelágicos menores como sardina y anchoveta (Valdez *et al.* 2018), los subproductos de descarte de otros procesos industriales como los generados durante el fileteado y enlatado de atún. Este proceso de reducción genera un efluente denominado “agua de cola” (AC) el cual representa, en promedio, el 60% del peso original de la materia prima (MP) utilizada (Pacheco-Aguilar *et al.* 2018). Esta AC presenta un alto contenido de sólidos disueltos y en suspensión, principalmente proteína, que actualmente son recuperados mediante procesos de evaporación y utilizados para enriquecer a las harinas producidas comercializadas bajo la denominación de harinas “prime” (Ortiz Silva 2003). El proceso de evaporación del AC genera considerables volúmenes de agua, con una carga de materia orgánica muy reducida cumpliendo, en la mayoría de las veces, con las normativas ambientales oficiales de los países productores (Vásquez Tafur *et al.* 2013).

El contenido de proteína en el AC, que varía desde 4 – 8%, dependiendo directamente de la especie utilizada (Rustad *et al.* 2011; García-Sifuentes *et al.* 2011; Valdez *et al.* 2018). Debido a esto, se puede posicionar a este efluente como MP para la recuperación de macrocomponentes. La recuperación proteica puede ser empleada para productos de consumo humano, siendo esencial como ingrediente/aditivo alimentario funcional para la producción de alimentos funcionales en lugar de la producción de harina de pescado “prime”.

Diferentes estudios realizados en el Laboratorio de Bioquímica y Calidad de Productos Pesqueros (LBCPP) del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), en Hermosillo, México, han implementado la recuperación de proteína de estos

estas matrices. Dicho grupo de trabajo somete el AC a una centrifugación complementaria de la cual se genera agua de cola centrifugada (ACC) y sólidos sedimentados (SS) (García-Sifuentes *et al.* 2008; Monjaraz 2018; Valdez *et al.* 2018).

El material proteico en el ACC ha sido parcialmente caracterizado en su componente funcional-tecnológico evaluando sus propiedades de solubilidad, de emulsificación y de espumeo, correlacionando estas propiedades con el peso molecular de diferentes fracciones proteicas/peptídicas recuperadas de la misma. En algunos casos, esta funcionalidad tecnológica ha mostrado ser igual e incluso superior a la de ingredientes/aditivos de uso común por la industria alimentaria como la albúmina de huevo o de suero bovino como estándares (Monjaraz 2018; Chi *et al.* 2014). Esto representa un potencial valor agregado para esta MP hasta hoy subestimada. Sin embargo, a pesar de todos los estudios realizados en el LBCPP, los SS que resultan de la centrifugación complementaria del AC de subproductos de atún y que representan el 8% (base seca) en peso del AC, no han sido evaluados en los términos que lo fueron aquellos en el ACC. Gracias a lo anterior, su estudio en los términos descritos anteriormente resulta conveniente (Valdez *et al.* 2018).

Por tanto, los objetivos del presente estudio fueron:

- Cuantificar y caracterizar la composición de los sólidos sedimentables obtenidos al aplicar centrifugación complementaria al agua de cola de subproductos del enlatado de atún.
- Evaluar las propiedades funcionales del material proteico/peptídico de los sólidos sedimentables.
- Proponer posibles usos funcionales de las proteínas/péptidos presentes en los sólidos sedimentables.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación.

El estudio se desarrolló en las instalaciones de los laboratorios de análisis proximal y del Laboratorio de Bioquímica y Calidad de Productos Pesqueros (LBCPP) de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), ubicado en Hermosillo, Sonora, México.

Obtención de materia prima.

La materia prima (MP) utilizada en esta investigación fueron los Sólidos Sedimentables (SS), recuperados por centrifugación complementaria del agua de cola (AC) proveniente de la producción de harina de pescado (figura 1), elaborada a partir de subproductos del proceso de enlatado de atún, que se encontraban en almacenamiento dentro de las instalaciones del centro de investigación. Sin embargo, previo a la obtención de las muestras experimentales se obtuvo el AC, fue proporcionada por la empresa MAZINDUSTRIAL – PINSA (Mazatlán, Sinaloa). Se realizaron dos muestreos de AC, durante el periodo de noviembre 2017 a febrero 2018 que indican diferentes épocas de pesca. El AC se recolectó en garrafones de 20 L mantenidos en hielo durante su transporte vía terrestre al LBCPP de CIAD, donde se almacenaron a -20 °C. El AC se descongeló (48 - 60 h) a temperatura ambiente (20 - 25 °C) para después separarse en alícuotas de 4 L. Las alícuotas se centrifugaron a $7,400 \times g$ a 20 ± 1 °C por 30 min en una centrífuga refrigerada (Modelo Avanti J-262 XOI, Beckman Instruments Inc. Palo Alto, CA). El sobrenadante (ACC) y los sedimentos fueron congelados a -80 °C y liofilizados (Labconco™ Freezone 12, Labconco, Kansas City, MO, USA) para su almacenamiento y posteriores análisis.

Determinación de la composición química y del pH.

La composición química (humedad, cenizas, grasas y proteína total) fue determinada de acuerdo a metodologías oficiales (AOAC 2000). La cuantificación de nitrógeno no proteico (NNP) se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Woyewoda *et al.* (1986), el cual se restó del contenido de proteína total para obtener el contenido de proteína neta de la muestra. El pH de las muestras fue determinado mediante potenciómetro en dispersiones de 2 g de muestra en 18 mL de agua Milli-Q.

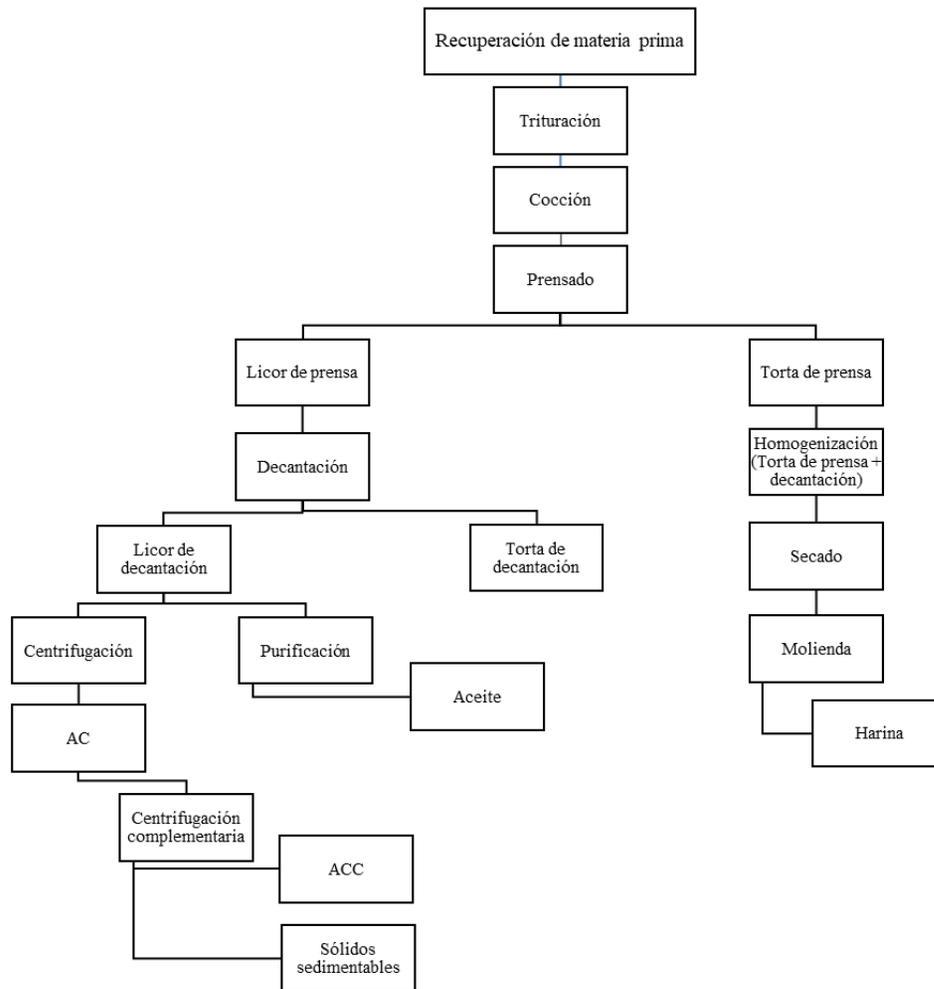


Figura 1. Diagrama de flujo del procesamiento de atún del cual deriva la producción de los sólidos sedimentables, muestra experimental del presente trabajo (Adaptado de Monjaraz, 2018).

Evaluación de propiedades funcionales de sólidos sedimentados.

Solubilidad en agua. La prueba de solubilidad se realizó mediante el método de Jiang *et al.* (2017) con algunas modificaciones. Se prepararon dispersiones para una concentración de proteína al 0.5% (p/v) en 20 mL de agua Milli-Q para cada muestra. Como paso adicional a la técnica, se realizó una homogenización durante un total de un minuto (30 segundos de homogenización - 30 segundo descanso – 30 segundos de homogenización) a 13,000 rpm en un homogeneizador de tejidos IKA® T25 digital Ultra Turrax® (Werke GmbH & Co. KG / Germany) con vástago chico (9.5 mm de diámetro interno). Después, se agitaron durante 30 min a temperatura ambiente utilizando un agitador magnético IKA® C-MAGHS 4 (Wilmington, NC, Estados Unidos de América) en nivel uno. Se determinó el contenido de proteína en la muestra (nitrógeno total) por el método de Biuret (Gornall *et al.* 1949) el cual consiste en medir la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-Visible CARY 50 Bio (Varian Australian Pty Ltd, Victoria, Australia) comparándose con la absorbancia

de una curva estándar creada con diferentes concentraciones de Albúmina de Suero Bovino (BSA, por sus siglas en inglés). Posteriormente, se realizó una centrifugación a $5000 \times g$ durante 15 min a $24 \text{ }^\circ\text{C}$ en una centrífuga refrigerada (Beckman Instruments INC., modelo Aventi J-26s XPI, Palo Alto, CA, Estados Unidos de América), y se cuantificó el contenido de proteína del sobrenadante, usando el mismo método. La solubilidad de los SS fue determinada de acuerdo a la ecuación 1 (García-Sifuentes *et al.* 2009).

$$\% \text{ Solubilidad: } \frac{(\text{Nitrógeno del sobrenadante})}{(\text{Nitrógeno total de la muestra})} \times 100 \quad [1]$$

Capacidad espumante (CE). Para determinar la CE de los SS se utilizó el método de Liu *et al.* (2013), con modificaciones. Se realizaron dispersiones de proteína al 1% en 20 mL de agua Milli-Q y se homogenizaron las en una placa de agitación IKA® C-MAGHS 4 (Wilmington, NC, Estados Unidos de América) en nivel 2 durante 5 min a temperatura ambiente. Después se incorporó aire con un homogenizador de tejidos IKA® T25 digital Ultra Turrax® (Werke GmbH & Co. KG / Germany) a 15,000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente. Se registró el volumen total (líquido más espuma) inmediatamente al finalizar la incorporación. Para calcular la CE de la muestra se utilizó la ecuación 2.

$$\% \text{ CE: } \frac{(\text{Volumen Líquido+Espuma})-\text{Líquido del volumen inicial}}{\text{Líquido del volumen inicial}} \times 100 \quad [2]$$

Estabilidad espumante (EE). Para determinar la EE se utilizó el método de “líquido drenado” usado por Waniska y Kinsella (1979), con modificaciones. Después de finalizar la incorporación de aire, se registró el volumen del líquido presente a los 0 min, el cual se consideró como 100%. Se monitoreó el volumen del líquido a cada minuto durante 10 min a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. La EE se graficó como porcentaje de líquido retenido por la espuma a través del tiempo.

Capacidad emulsificante (CEm). Se determinó la CEm de los sólidos mediante la técnica de conductividad usada por Kato (1985). Se prepararon dispersiones de 0.01% de proteína (p/v) en 150 mL de agua Milli-Q para cada muestra, al igual que Albúmina de Huevo (AH) usado como proteína patrón, para después ser homogenizadas durante 5 min a temperatura ambiente en un agitador magnético IKA® C-MAGHS 4 (Wilmington, NC, Estados Unidos de América) en nivel 2. Posteriormente, se utilizaron de forma simultánea un conductímetro Hanna HI 255 calibrado con agua Milli-Q y un homogenizador de tejidos IKA® T25 digital Ultra Turrax® a 6,000 rpm con un vástago grande (19 mm diámetro interno) durante un minuto para obtener la lectura de conductividad inicial de la muestra. Continuamente, sin parar la homogenización, se adicionó aceite de soya (Nutrioli®, Monterrey, México) a un flujo de 0.042 mL/s. La velocidad de homogenización se aumentó a 9,000 rpm después de llegar a los 45 mL de aceite agregados. Se creó una emulsión de aceite en agua (O/W) registrando las lecturas de conductividad por cada mL adicionado. El aceite fue agregado hasta llegar a una inversión de fases, indicada por un cambio brusco y repentino de conductividad, que indicó el colapso de la emulsión. En este punto, se detuvo la adición y se registró la cantidad de aceite utilizado. Los valores de CEm se reportaron como mL de aceite emulsificado por gramo de proteína.

Índice de actividad emulsificante (IAE). Se midió el IAE utilizando el método de Moure *et al.* (2005) con modificaciones. Se realizaron dispersiones de 0.01% (p/v) de proteína en 20 mL de agua Milli-Q y se homogenizó con aceite 6.6 mL de aceite de soya (Nutrioli®, Monterrey, México) en un homogenizador de tejidos IKA® T25 digital Ultra Turrax® (Werke GmbH & Co. KG / Germany) con vástago grande (19 mm de diámetro interno) durante un minuto a 10,000 rpm, para crear una emulsión aceite en agua (O/W). Inmediatamente, se tomó un alícuota de 50 µL del fondo del recipiente y se diluyó en 5 mL de dodecilsulfato sódico (SDS) al 0.1% (p/v) y se midió la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro UV-Visible CARY 50 Bio (Varian Australian Pty Ltd, Victoria, Australia). Se determinó el IAE de los sólidos mediante la ecuación 3.

$$IAE \left(\frac{m^2}{g} \right) : 2 \times \frac{2.303 \times A_0 \times D}{0.25 \times 0.001 \times 10,000} \quad [3]$$

Donde A_0 es la absorbancia a cero min y D será el factor de dilución (100).

Estabilidad emulsificante (EEm). Se medirá la EEm de los sólidos mediante el método de Jamdar *et al.* (2010) con modificaciones. Se dejó reposar la emulsión generada para IAE por 60 minutos para luego tomar una alícuota de 50 µL del fondo del recipiente. A esta alícuota se le agregó 5 mL de SDS al 0.1% (p/v) y se midió absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro UV-Visible CARY 50 Bio (Varian Australian Pty Ltd, Victoria, Australia). Se determinará la estabilidad emulsificante de los sólidos usando las absorbancias obtenidas (A_0 y A_{60}) en la ecuación 4.

$$\%EEm: \frac{A_0 \times A_{60}}{A_0} \times 100 \quad [4]$$

Donde A_0 es la absorbancia a cero min y A_{60} es la absorbancia a los 60 min.

Diseño experimental.

Para la evaluación de los sólidos sedimentables recuperados del agua de cola de atún se usó un diseño experimental de muestras independientes. Los análisis a cada muestra se realizaron por duplicado (n=2). Se realizó un análisis estadístico de medias mediante una prueba “t - Student” con un nivel de significancia del 5% (0,05) utilizando el programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS® versión 9.4®) para evaluar los datos obtenidos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición química y pH.

La composición proximal de los SS recuperados del AC de atún se muestran en el cuadro 1. La humedad, ceniza, Nitrógeno No Proteico (NNP), grasa, proteína cruda y neta de los SS recuperados fueron diferentes ($P < 0.05$) entre muestras recolectadas en noviembre del 2017 y enero del 2018. El rango de proteína neta de SS en esta investigación se encontró por debajo de lo observado por García-Sifuentes *et al.* (2011) quien reportó rangos de proteína neta en SS de 53 – 70%. Por otra parte, también se presentaron porcentajes de proteína para el AC de 70 – 86% proveniente de la producción de harina de pescado; usándose como materia prima subproductos del fileteo de bacalao y abadejo (cabezas, vísceras, esqueletos y piel). Los resultados sugieren que existió diferencia debido a factores como: la especie que se use para producción de harina, la condición fisiológica de la especie, la temporada de captura y su procesamiento (García-Sifuentes *et al.* 2011; Mahdabi y Hosseini Shekarabi 2018). La sumatoria de la composición química de los SS recuperados del AC atún no sumaron el 100%, debido a que no se evaluaron carbohidratos y la fibra de los SS.

Cuadro 1. Composición química en porcentajes de base seca de los sólidos sedimentables recuperados del Agua de Cola de atún.

SS	Humedad	Cenizas	Proteína Cruda	NNP	Proteína Neta	Grasa
M1	4.47 ± 0.11 ^b	5.51 ± 0.15 ^b	49.22 ± 1.53 ^b	1.31 ± 0.03 ^b	47.91 ± 1.53 ^b	8.50 ± 0.07 ^a
M2	6.22 ± 0.25 ^a	8.59 ± 0.16 ^a	60.60 ± 2.11 ^a	3.03 ± 0.02 ^a	57.57 ± 2.13 ^a	4.87 ± 0.28 ^b
CV	3.26	2.31	3.29	1.56	3.44	3.27

^{ab} Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$). SS: Sólidos Sedimentables. M1: Muestreo noviembre 2017. M2: Muestreo enero 2018. NNP: nitrógeno no proteico. CV: Coeficiente de Variación (%).

En el cuadro 2 se presenta la concentración de hidrógeno de los SS. La M2 presentó mayor pH que M1 ($P < 0.05$). El pH promedio de ambas muestras (5.3) fue menor al de la muestra de origen (5.8) reportado por Ponce (2018). Ese cambio se debe al proceso de centrifugación que permite la separación de complejos con interacción de proteína-agua de los SS afectando el perfil de potencial de hidrógeno de las proteínas/péptidos de los sólidos sedimentables (Carvajal-García *et al.* 2015).

Cuadro 2. pH de los Sólidos sedimentables provenientes de Agua de Cola de atún.

Sólidos Sedimentables	pH
M 1	5.21 ± 0.007 ^b
M 2	5.52 ± 0.014 ^a
CV	0.13

^{ab} Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$). M1: Muestreo noviembre 2017. M2: Muestreo enero 2018. CV: Coeficiente de Variación (%).

Solubilidad en agua.

La solubilidad de los SS recuperados de la CC del AC de atún se muestran en la figura 2. Los resultados mostraron que la solubilidad de la Albúmina de Suero Bovino (BSA) fue de 100%, mientras que la solubilidad de los muestreos 1 (2017) y 2 (2018) fue de 21 y 14%, respectivamente, siendo estas diferencias significativas estadísticamente. Esto indica que los SS del presente estudio tienen baja capacidad de solubilidad en comparación a la proteína patrón (BSA). Sin embargo, se han reportado solubilidades para la fracción insoluble del ACC en un rango comprendido entre 13 – 44% a pH 5 usando soluciones con TCA y HCl (García-Sifuentes *et al.* 2009). De acuerdo con Carvajal- Carvajal-García *et al.* (2015), la disminución o aumento de solubilidad es un reflejo de la presencia de complejos proteína-proteína y/o proteína-lípido presentes en las muestras, que no pueden ser solubilizados, excepto en condiciones alcalinas. En estas se produce una fraccionación de proteínas aumentando considerablemente la solubilidad. Por otro lado, la solubilidad de las proteínas puede ser afectada, no solamente por el pH, también pueden presentar mejores propiedades de acuerdo con la temperatura a la que es sometida (García-Sifuentes *et al.* 2008).

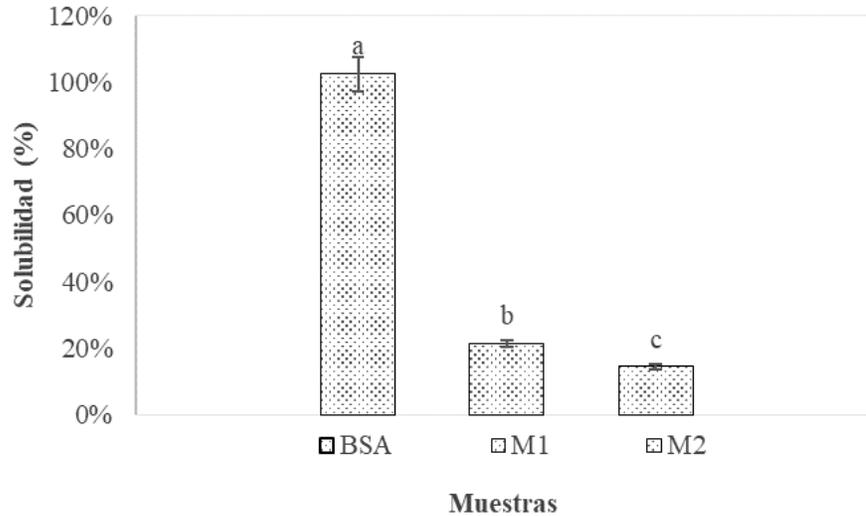


Figura 2. Solubilidad de Albúmina de Suero Bovino (BSA) y de las muestras de los Sólidos Sedimentables recuperados del Agua de Cola de atún. M1: Muestreo noviembre 2017. M2: Muestreo enero 2018. ^{abc} Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$)

Capacidad espumante (CE).

La CE de las proteínas presentes en los SS recuperados del ACC se muestra en la figura 3. Los resultados presentados, indican que la CE de los SS fue diferente entre muestras ($P < 0.05$). Además, presentan diferencias significativas en comparación al estándar (BSA), ya que la CE expuesta por los muestreos 1 y 2 fue 6.88 y 16.25% respectivamente, mientras que el BSA tiene una CE de 53 - 75%, es decir que, los SS representan menos del 30% de la capacidad del estándar. Los resultados sugieren que existe la presencia de proteínas/péptidos con peso molecular muy variable, por lo que pudieran no haber tenido un balance adecuado de aminoácidos hidrofóbicos-hidrofílicos (Ponce 2018). Cabe recalcar que, se han reportado este tipo de matrices con baja capacidad espumante, por lo tanto, se puede establecer como una característica propia de los SS recuperados (Pacheco-Aguilar *et al.* 2008; Mahdabi y Hosseini Shekarabi 2018). Los péptidos de muy bajo peso molecular no son capaces de mantener una orientación interfacial ordenada, lo cual muestra una disminución de las propiedades espumantes (Wang 2013; Mbatia *et al.* 2014; Chi *et al.* 2014).

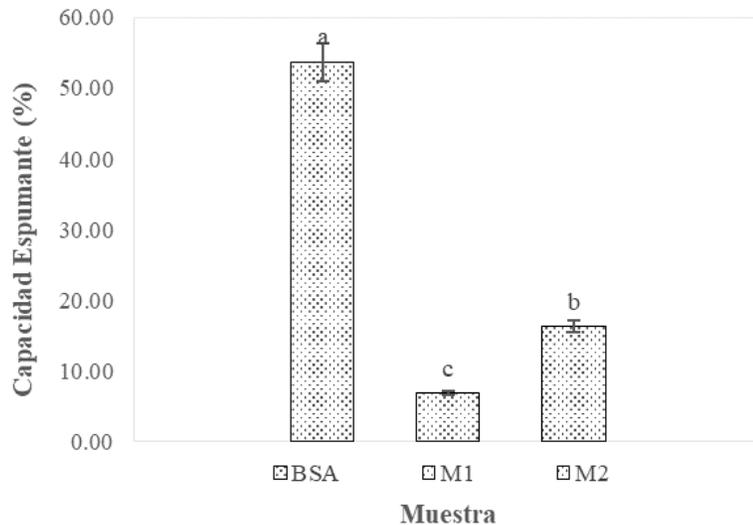


Figura 3. Capacidad espumante de Albúmina de Suero Bovino (BSA) y los muestreos de los Sólidos Sedimentables recuperados del Agua de Cola de atún. M1: Muestreo noviembre 2017. M2: Muestreo enero 2018. ^{abc} Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

Estabilidad espumante (EE).

La EE de los SS recuperados de la CC del AC se muestra en la figura 4. El comportamiento de los muestreos fue diferente de la proteína patrón. El M1, drenó todo el líquido al llegar a los 4 min de reposo, mientras que el M2 mantuvo mayor estabilidad a través del tiempo. Este último mantiene estable el 27% de espuma, mientras que el estándar (BSA), presentó una EE de 22% al finalizar el tiempo del análisis.

Las muestras presentaron esas diferencias en su composición ya que los valores de EE sugieren que contienen pesos moleculares dentro de las proteínas/péptidos que pueden afectar la interface aire-agua, por lo cual pueden formar espumas inestables (Ponce 2018; Halim *et al* 2016). Sin embargo, el M2 presentó una composición que contiene interacciones proteína-proteína, las cuales crean un film más fuerte, por ende, más estabilidad de espuma. Esto se puede explicar por el efecto de las fuerzas de cohesión entre moléculas, debido a la presencia de grupos hidrofóbicos existentes en la cadena peptídica, los cuales se despliegan y se reacomodan en la interfase impidiendo el drenaje del líquido en la espuma (Ahmad y Benjakul 2010).

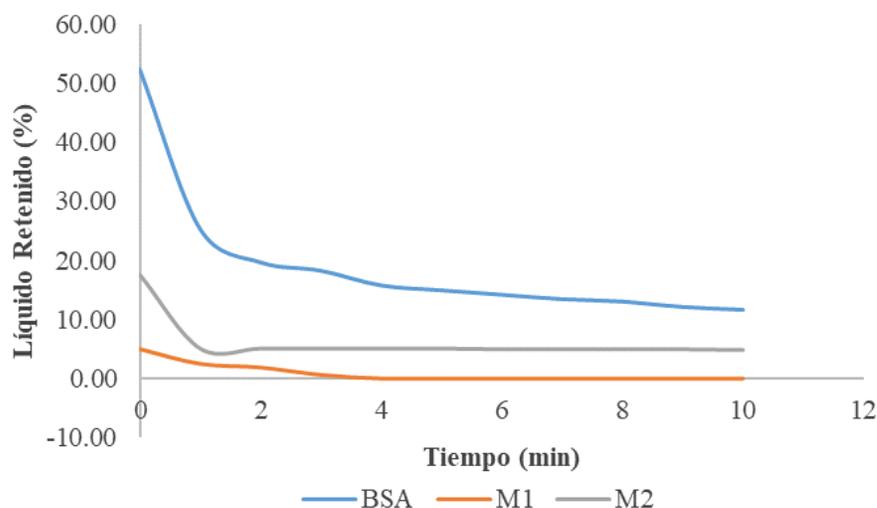


Figura 4. Estabilidad espumante de Albúmina de Suero Bovino (BSA) y los muestreos de los Sólidos Sedimentables recuperados del Agua de Cola de atún. M1: Muestreo noviembre 2017. M2: Muestreo enero 2018.

Capacidad emulsificante (CEm).

La CEm de los SS recuperados de la centrifugación complementaria del AC se presentan en la figura 5. Los resultados mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) con la proteína patrón AH para las muestras de SS. Bajo condiciones de estudio, la AH tuvo una CEm de 96 mL de aceite emulsificado / g de proteína, mientras que los M1 y 2 presentaron valores de CEm correspondientes al 47 y 70%, respectivamente, en comparación con la proteína patrón. Esto demuestra que los SS recuperados del AC de atún, contienen fracciones con rangos de peso molecular muy amplios de proteínas/péptidos que le brindan una funcionalidad considerable para CEm. Los valores de CEm para SS fueron cercanos a los reportados por Sathiviel y Betchel (2006) de los subproductos de harina de pescado.

Las propiedades fisicoquímicas de las proteínas/péptidos juegan un papel importante en las propiedades emulsificante, entre ellas se encuentra la hidrofobicidad de los aminoácidos. Los resultados sugieren que hubo una modificada por los amplios pesos moleculares de las proteínas/péptidos presentes en su composición que pueden estabilizar la interfase de aceite/agua que se busca en la emulsión (Lam y Nickerson 2013; Jemil 2014; Ozturk *et al.* 2014). De acuerdo a los resultados de Chalamaiah *et al.* (2012) dentro las cadenas de péptidos de los hidrolizados, la mayoría aminoácidos son hidrofóbicos (alanina, la leucina, la isoleucina, la valina, la prolina, la fenilalanina, y la metionina). Yu *et al.* (2013), indicaron que las proteínas se adhieren fuertemente a las superficies terminadas en metilo hidrofóbico (CH_3) a través de interacciones hidrófobas, pero solo débilmente a las superficies terminadas en OH a través de H- unión.

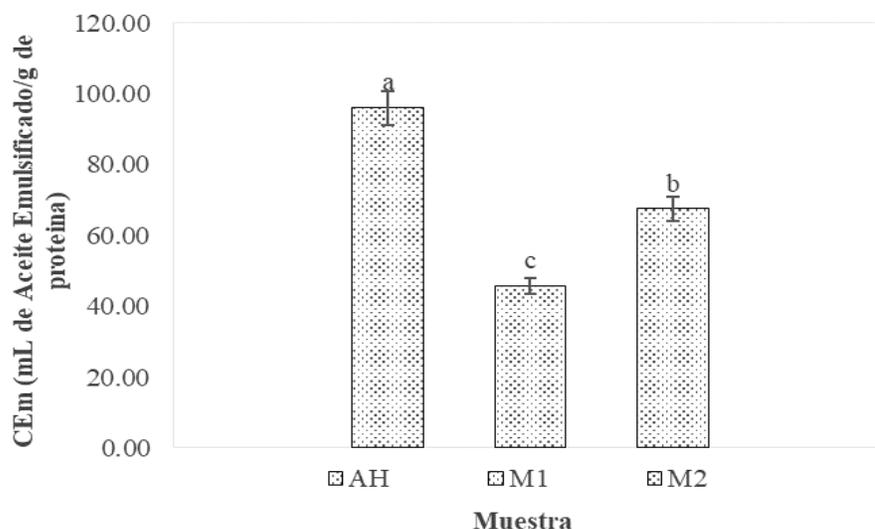


Figura 5. Capacidad emulsificante de Albúmina de Huevo (AH) y los muestreos de los Sólidos Sedimentables recuperados del Agua de Cola de atún. M1: Muestreo noviembre 2017. M2: Muestreo enero 2018. ^{abc} Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

Índice de actividad emulsificante (IAE).

El IAE estima la capacidad de la proteína para ayudar en la formación de la emulsión indicada por el área de interface que se estabiliza por unidad de peso de proteína (Pearce y Kinsella, 1978). Este parámetro se encuentra asociado al área de las gotas de aceite dispersas en función del volumen de aceite y de la concentración de proteína usada en la solución.

El IAE de los SS recuperados de la CC del AC de atún se muestran en la figura 6. Los valores difirieron entre sí ($P < 0.05$), esto indica que no poseen similitud en comparación al estándar (AH) ya que el M2 presenta 21.30 m² de interfase estabilizada por gramo de proteína (m² / g), es decir, representa aproximadamente la mitad de IAE del estándar (AH). Esto puede deberse a la composición de aminoácidos en las proteínas/péptidos presentes en las fracciones. Según McClements *et al.* (2017), una conformación flexible le permite a la proteína reorganizarse después de ser absorbidos en las superficies de las gotas de aceite dado a que los cambios en el sistema alteran el balance entre las interacciones moleculares de sus aminoácidos, lo que justifica el IAE presentado por los SS.

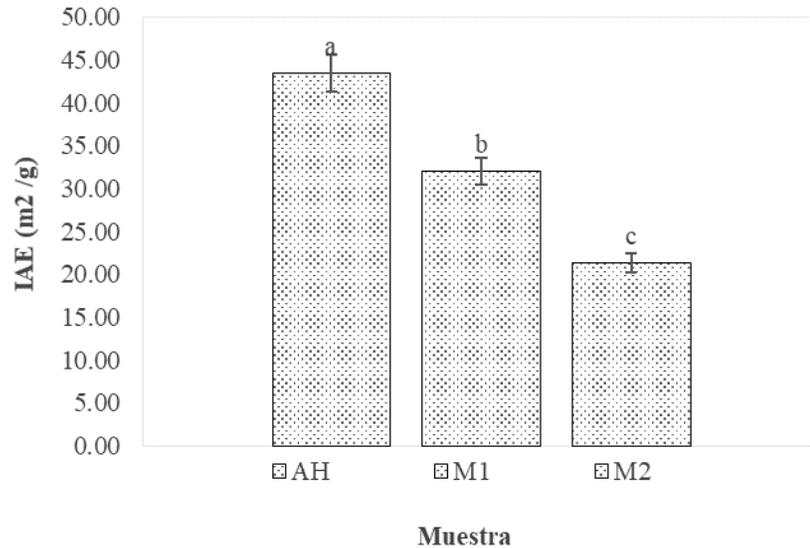


Figura 6. Índice de actividad emulsificante de Albúmina de Huevo (AH) y los muestreos de los Sólidos Sedimentables recuperados del Agua de Cola de atún. M1: M1: Muestreo noviembre 2017. M2: Muestreo enero 2018. ^{abc} Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

Estabilidad emulsificante (EEm).

Los resultados de EEm obtenidos para los SS recuperados de la AC se muestran en la figura 7. Las M1 y 2 presentaron EEm de 40 y 56%, respectivamente, sin diferencias estadísticas ($P > 0.05$) de la proteína patrón (AH) con un 56% después del tiempo de análisis. Los resultados sugieren una similitud debido al amplio peso molecular que existe en los SS. La variación en los pesos moleculares de las proteínas/péptidos presentes en los SS pueden influir en la distribución de sus regiones hidrofóbicas/hidrofílicas (Ozturk *et al.* 2014). Según Liu *et al.* (2013), las proteínas/péptidos afectadas por el pH y son capaces de crear mejores ajustes de aminoácidos en la interfase aceite/agua, lo cual conlleva a una emulsión más estable. Según Pacheco-Aguilar *et al.* (2008), valores mayores de EEm indican que las emulsiones perdieron menos turbidez después de 60 min de reposo y por lo tanto son más estables. Esto indica que los SS pueden ser usados como emulsificantes ya que, a pesar de no presentar mayor EEm en comparación al patrón, las emulsiones desarrolladas son similares en sí.

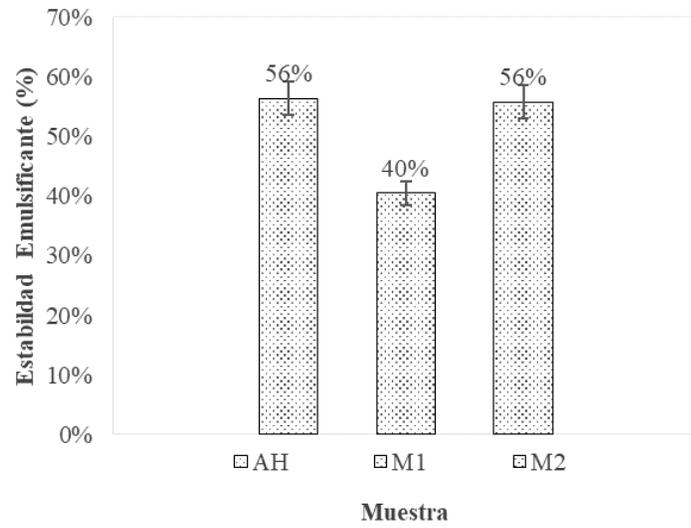


Figura 7. Estabilidad emulsificante de Albúmina de Huevo (AH) y los muestreos de los Sólidos Sedimentables recuperados del Agua de Cola de atún. M1: M1: Muestreo noviembre 2017. M2: Muestreo enero 2018.

4. CONCLUSIONES

- Se obtuvo una cantidad de material proteico mayor al 50% del total de los sólidos sedimentables recuperados de la centrifugación complementaria del agua de cola de atún.
- La funcionalidad de los sólidos sedimentables fue menor a la de los estándares establecidos, exceptuando las propiedades emulsificantes que exhibieron características similares a la del estándar utilizado.
- Las proteínas/péptidos presentes en los sólidos sedimentables muestran potencial para una sustitución parcial de los mismos y para ser usados como ingrediente alimentario en emulsiones de aceite en agua (O / W).

5. RECOMENDACIONES

- Realizar investigaciones evaluando métodos para desodorizar este subproducto proveniente del procesado de atún, así como también para otras especies pelágicas.
- Desarrollar más investigaciones con las propiedades emulsificantes de los sólidos sedimentables recuperados.
- Desarrollar un ingrediente alimentario a base de sólidos sedimentables recuperados del agua de cola o usarlo en sustituciones parciales para incrementar la cantidad proteica.
- Realizar pruebas de emulsiones en alimentos tipo “aderezo”, como mayonesa o similares, y evaluar su comportamiento.

6. LITERATURA CITADA

- Achour M, Khelifi O, Bouazizi I, Hamdi M. 2000. Design of an integrated bioprocess for the treatment of tuna processing liquid effluents. *Process Biochemistry*. 35(9): 1013–1017. doi:10.1016/S0032-9592(00)00133-3.
- Ahmad M, Benjakul S. 2010. Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. *Food Hydrocolloids*. 25(3):381–388. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X10001426>. doi:10.1016/j.foodhyd.2010.07.004.
- AOAC The Association of Official Analytical Chemists. 2000. *Official Methods of Analysis*. 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- Bechtel PJ. 2005. Properties of Stickwater from Fish Processing Byproducts. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 14(2): 25–38. doi:10.1300/J030v14n02_03.
- Carvajal-García AV, Cortés-Ruiz JA, Méndez-Gómez E, Rivas-Montaña AM, Márquez-Ríos E, Rodríguez-Ruelas CK. 2015. Calidad tecnológica y frescura del atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) empleado como materia prima en la industria procesadora de Mazatlán, Sinaloa. *Biotecnia*. XVII(1):24–31.
- Chalamaiah M, Dinesh Kumar B, Hemalatha R, Jyothirmayi T. 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chemistry*. 135(4):3020–3038. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2012.06.100.
- Chi C-F, Cao Z-H, Wang B, Hu F-Y, Li Z-R, Zhang B. 2014. Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. *Molecules*. 19(8): 11211–11230. eng. doi:10.3390/molecules190811211.
- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA). 2016. Consumo per cápita anual de pescados y mariscos llega a 12 kg. México: [publisher unknown]; [accessed 2019 Sep 3]. <https://www.gob.mx/conapesca/prensa/consumo-per-capita-anual-de-pescados-y-mariscos-llega-a-12-kg-conapesca>.
- FAO Food and Agriculture Organization. 2018. *El estado mundial de la pesca y acuicultura 2018: Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible*. FOOD & AGRICULTURE ORG. ISBN: 978-92-5-130688-8.
- García-Sifuentes CO, Pacheco-Aguilar R, Ramírez-Suárez JC, Carvallo Ruíz G. 2011. Stickwater multi-step treatment: Effect on organic material removal introduction. *Biotecnia*; [accessed 2019 Sep 3]. XIII(1):10–16. <https://>

www.researchgate.net/publication/261358813_STICKWATER_MULTI-STEP_TREATMENT_EFFECT_ON_ORGANIC_MATERIAL_REMOVAL_INTRODUCTION.

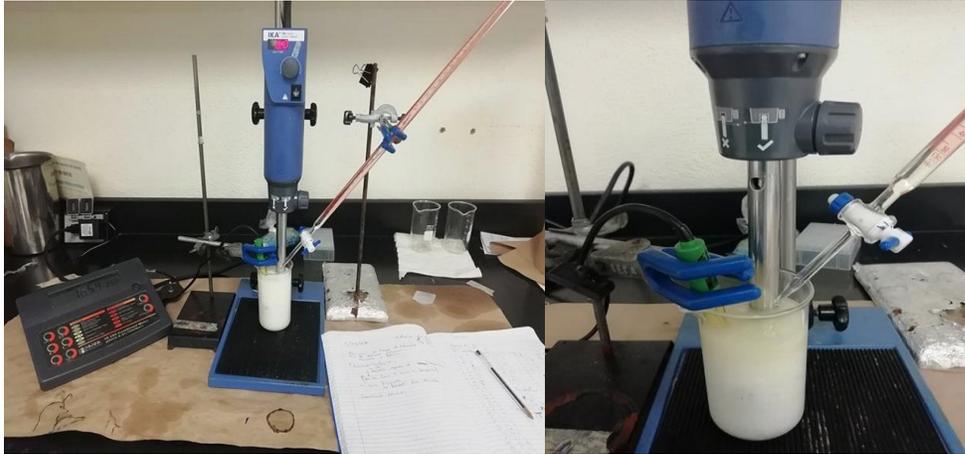
- García-Sifuentes CO, Pacheco-Aguilar R, Valdez S, Márquez ME, Lugo ME, Ezquerro JM. 2009. Impacto del agua de cola de la industria pesquera: tratamientos y usos Impact of stickwater produced by the fishery industry: treatment and uses. *CyTA - Journal of Food*. 7(1): 67–77. doi:10.1080/11358120902850412.
- García-Sifuentes CO, Pacheco-Aguilar R, Lugo M, García G, Ramirez JC, García F. 2008. Properties of recovered solids from stick-water treated by centrifugation and pH shift. *Food Chemistry*. 114(1): 197–203. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.064.
- Gornall A, Bardawill C, David M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of biological chemistry*. 177(2): 751–766.
- Goycoolea FM, Nieblas JM, Noriega LO, Higuera I. 1997. Temperature and concentration effects on the flow behaviour of stickwater. *Bioresource Technology*. 59(2): 217–225. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852496001459>. doi:10.1016/S0960-8524(96)00145-9.
- Guerrero L, Omil F, Méndez R, Lema JM. 1997. Protein recovery during the overall treatment of wastewaters from fish-meal factories. *Bioresource Technology*. 63(3): 221–229. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852497001405>. doi:10.1016/S0960-8524(97)00140-5.
- Halim NRA, Yusof HM, Sarbon NM. 2016. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*. 51:24–33. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224415300029>. doi:10.1016/j.tifs.2016.02.007.
- Jamdar SN, Rajalakshmi V, Pednekar MD, Juan F, Yardi V, Sharma A. 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*. 121(1): 178–184. doi:10.1016/j.foodchem.2009.12.027.
- Jemil I, Jridi M, Nasri R, Ktari N, Ben Slama-Ben Salem R, Mehiri M, Hajji M, Nasri M. 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochemistry*. 49(6): 963–972. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511314001366>. doi:10.1016/j.procbio.2014.03.004.
- Jiang W, Hu S, Li S, Liu Y. 2017. Biochemical and antioxidant properties of peptidic fraction generated from crab (*Portunus trituberculatus*) shells by enzymatic hydrolysis. *Int J Food Sci Technol*. 52(11): 2479–2488. doi:10.1111/ijfs.13533.
- Kato A, Fujishige T, Matsudomi N, Kobayashi K. 1985. Determination of emulsifying properties of some proteins by conductivity measurements. *Journal of Food Science*. 50(1): 56–58.

- Lam RSH, Nickerson MT. 2013. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure–function approach. *Food Chemistry*. 141(2): 975–984. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613004846>. doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.038.
- Liu Y, Li X, Chen Z, Yu J, Wang F, Wang J. 2013. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. *Food Chemistry*. 151:459–465. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.089.
- Mahdabi M, Hosseini Shekarabi SP. 2018. A Comparative Study on Some Functional and Antioxidant Properties of Kilka Meat, Fishmeal, and Stickwater Protein Hydrolysates. *Journal of Aquatic Food Product Technology*; [accessed 2019 Apr 11]. 27(7): 844–858. doi:10.1080/10498850.2018.1500503.
- Mbatia B, Ogonda LA, Muge EK, Mulaa FJ. 2014. Antioxidative and functional properties of *Rastrineobola argentea* (Dagaa) fish protein hydrolysate. *Discourse Journal of Agriculture and Food Sciences*. 2(6): 180–189. English.
- McClements DJ, Bai L, Chung C. 2017. Recent Advances in the Utilization of Natural Emulsifiers to Form and Stabilize Emulsions. *Annu Rev Food Sci Technol*. 8: 205–236. eng. doi:10.1146/annurev-food-030216-030154.
- Monjaraz K. 2018. Propiedades funcional-tecnológicas de la fracción proteica/peptídica >30 kDa parcialmente hidrolizada recuperada del agua de cola centrifugada de subproductos de atún. [Tesis de maestría]. Hermosillo, Sonora: CIAD, C. A., Coordinación de tecnología de alimentos de origen animal. 82 p.
- Moure A, Domínguez H, Parajó JC. 2005. Fractionation and enzymatic hydrolysis of soluble protein present in waste liquors from soy processing. *J Agric Food Chem*. 53(19): 7600–7608. eng.
- Ortiz Silva D. 2003. Elaboración de harina de pescado [Tesis de licenciatura]. Buenos Aires, Argentina: Universidad Católica Argentina, Facultad de Ciencias Agrarias. 137 p.
- Ozturk B, Argin S, Ozilgen M, McClements DJ. 2015. Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural biopolymers: Whey protein isolate and gum arabic. *Food Chemistry*. 188:256–263. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2015.05.005.
- Pacheco-Aguilar R, Calderon de la Barca, A. M., Castillo-Yañez FJ, Márquez-Ríos E, Garcia-Carreño LF, Valdez-Hurtado S. 2018. Comparación del efecto de dos tratamientos enzimáticos con actividad colagenasa y una centrifugación complementaria en las características fisicoquímicas del agua de cola generada por la industria sardinera. *Biotecnia*. XX(3):58–64.
- Pacheco-Aguilar R, Mazorra MA, Ramírez JC. 2008. Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chemistry*. 109(4): 782–789. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2008.01.047.
- Pearce K, Kinsella JE. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J Agric Food Chem*. 26(3):716–723.

- Ponce O. 2018. Fracciones proteicas/peptídicas funcional-tecnológicas $\leq 30\text{kDa}$ recuperadas de agua de cola centrifugada de subproductos de atún. [Tesis de maestría]. Hermosillo, Sonora: CIAD, C. A., Coordinación de ciencia y tecnología de alimentos de origen animal. 75 p.
- Rustad T, Storrø I, Slizyte R. 2011. Possibilities for the utilization of marine by-products. *International Journal of Food Science & Technology*. 46(10): 2001–2014. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02736.x.
- Sathivel S, Bechtel PJ. 2006. Properties of soluble protein powders from Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*). *Int J Food Sci Tech*. 41(5): 520–529. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.01101.x.
- Valdez S, Goycoolea FM, Márquez E, Pacheco-Aguilar R. 2018. Efecto de una centrifugación complementaria en la composición química y reológica del agua de cola. *Biotecnia*. XX(2): 95–103.
- Vásquez Tafur A, Aguinaga Mogollón E, Zegarra Riofrío A, Timaná Taboada F. 2013. Propuesta de mejora de tratamientos de aguas residuales en una empresa pesquera. Piura, Perú: Universidad de Piura. https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/1712/_Informe_Final___PMTAR.pdf?sequence=1.
- Wang W, Li Z, Liu J-Z, Wang Y-J, Liu S-H, Sun M. 2013. Comparison between thermal hydrolysis and enzymatic proteolysis processes for the preparation of tilapia skin collagen hydrolysates. *Czech J. Food Sci*. 31(No. 1): 1–4. doi:10.17221/49/2012-CJFS.
- Waniska RD, Kinsella JE. 1979. Foaming properties of proteins: Evaluation of a column aeration apparatus using ovalbumin. *Journal of Food Science*. 44(5): 1398–1402.
- Woyewoda AD, Shaw SJ, Ke PJ, Burns BG. 1986. Recommended Laboratory Methods for Assessment of Fish Quality. Halifax, Nova Scotia: [publisher unknown]. 151 p. (Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences; vol. 1448).
- Yu J, Kan Y, Rapp M, Danner E, Wei W, Das S, Miller DR, Chen Y, Waite JH, Israelachvili JN. 2013. Adaptive hydrophobic and hydrophilic interactions of mussel foot proteins with organic thin films. *PNAS*. 110(39):15680–15685. <https://www.pnas.org/content/pnas/110/39/15680.full.pdf>. doi:10.1073/pnas.1315015110.

7. ANEXOS

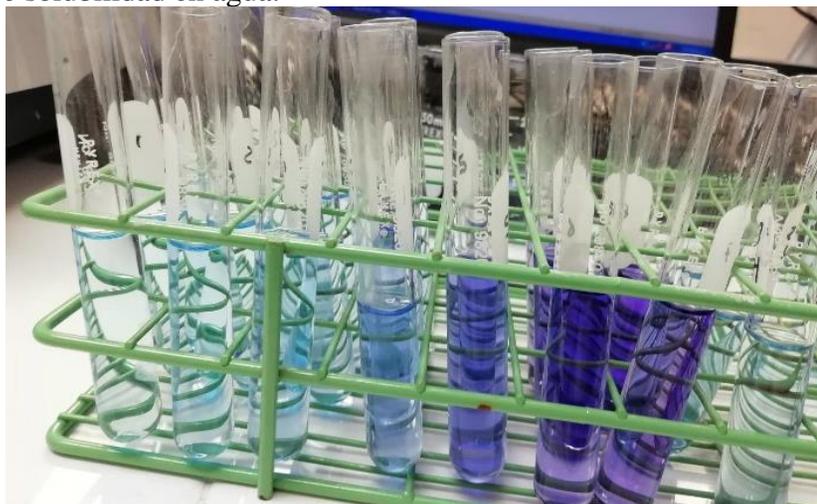
Anexo 1. Estructura de materiales y equipos usados para evaluación de capacidad emulsificante (CEm).



Anexo 2. Equipos de digestión (izquierda) y destilación (derecha) usados en la técnica de Micro Kjeldahl.



Anexo 3. Tubos de ensayo con reactivo de Biuret para realizar curva de estándar en evaluación de solubilidad en agua.



Anexo 4. Tubos de recuperación de éter graduados para realizar evaluación de estabilidad espumante (EE).



Anexo 5. Cuadro de resultados estadísticos de análisis de Solubilidad.

	Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
BSA - M2017	Pooled	Equal	10	52.01	<.0001
	Satterthwaite	Unequal	8.9329	52.01	<.0001
BSA - M2018	Pooled	Equal	10	90.11	<.0001
	Satterthwaite	Unequal	6.9159	90.11	<.0001
M2017 – M2018	Pooled	Equal	10	5.16	0.0004
	Satterthwaite	Unequal	5.9597	5.16	0.0021

Anexo 6. Cuadro de igualdad de varianzas de análisis de Solubilidad.

	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
BSA - M2017	Folded F	5	5	2.06	0.4477
BSA - M2018	Folded F	5	5	5.02	0.1012
M2017 – M2018	Folded F	5	5	10.32	0.0228

Anexo 7. Cuadro de resultados estadísticos de análisis de Capacidad Espumante.

	Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
BSA - M2017	Pooled	Equal	6	14.62	<.0001
	Satterthwaite	Unequal	3.9458	14.62	<.0001
BSA - M2018	Pooled	Equal	6	11.62	<.0001
	Satterthwaite	Unequal	4.0268	11.62	0.0003
M2017 – M2018	Pooled	Equal	6	-5.42	0.0016
	Satterthwaite	Unequal	5.9887	-5.42	0.0016

Anexo 8. Cuadro de igualdad de varianzas de análisis de Capacidad Espumante

	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
BSA - M2017	Folded F	3	3	6.18	0.1688
BSA - M2018	Folded F	3	3	5.67	0.1881
M2017 – M2018	Folded F	3	3	1.09	0.9447

Anexo 9. Cuadro de resultados estadísticos de análisis de Capacidad Emulsificante.

	Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
BSA - M2017	Pooled	Equal	6	15.11	<.0001
	Satterthwaite	Unequal	3.1862	15.11	0.0005
BSA - M2018	Pooled	Equal	6	8.71	0.0001
	Satterthwaite	Unequal	3.1998	8.71	0.0025
M2017 – M2018	Pooled	Equal	6	-4.89	0.0027
	Satterthwaite	Unequal	5.9926	-4.89	0.0028

Anexo 10. Cuadro de igualdad de varianzas de análisis de Capacidad Emulsificante.

	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
BSA - M2018	Folded F	3	3	30	0.0195
BSA - M2018	Folded F	3	3	30	0.0195
M2017 – M2018	Folded F	3	3	1.07	0.9552

Anexo 11. Cuadro de resultados estadísticos de análisis de Índice de Actividad Emulsificante.

	Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
BSA - M2017	Pooled	Equal	6	2.56	0.0431
	Satterthwaite	Unequal	5.5801	2.56	0.046
BSA - M2018	Pooled	Equal	6	6.36	0.0007
	Satterthwaite	Unequal	5.7653	6.36	0.0008
M2017 – M2018	Pooled	Equal	6	2.55	0.0437
	Satterthwaite	Unequal	4.9854	2.55	0.0516

Anexo 12. Cuadro de igualdad de varianzas de análisis de Índice de Actividad Emulsificante.

	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
BSA - M2018	Folded F	3	3	1.76	0.6552
BSA - M2018	Folded F	3	3	1.51	0.7449
M2017 – M2018	Folded F	3	3	2.64	0.4457

Anexo 13. Cuadro de resultados estadísticos de análisis de Estabilidad Emulsificante.

	Method	Variances	DF	t Value	Pr > t
BSA - M2017	Pooled	Equal	6	1.88	0.1086
	Satterthwaite	Unequal	5.8717	1.88	0.1097
BSA - M2018	Pooled	Equal	6	0.12	0.9111
	Satterthwaite	Unequal	5.8407	0.12	0.9112
M2017 – M2018	Pooled	Equal	6	-1.63	0.1535
	Satterthwaite	Unequal	5.9981	-1.63	0.1535

Anexo 14. Cuadro de igualdad de varianzas de análisis de Estabilidad Emulsificante.

	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
BSA - M2018	Folded F	3	3	1.35	0.8125
BSA - M2018	Folded F	3	3	1.4	0.7907
M2017 – M2018	Folded F	3	3	1.04	0.9774