



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BASICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

**"PRODUCCION ENZIMATICA DE HIDROLIZADOS
PROTEICOS A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DE LA
INDUSTRIA PESQUERA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

ING. MARIA TERESA SUMAYA MARTINEZ

TUTOR: DRA. ARELY PRADO BARRAGAN

ASESORES: DR. SERGIO HUERTA OCHOA

DR. ERNESTO FAVELA TORRES

MEXICO, D. F.

MAYO 2001

RESUMEN

Esta tesis de investigación se dividió en nueve capítulos, en el capítulo dos se presentó una revisión bibliográfica sobre las características proteicas del pescado y del proceso de optimización de la hidrólisis enzimática de proteínas. En el tercer capítulo se expusieron los objetivos planteados para esta tesis. En el capítulo cuatro se presentaron los materiales y métodos utilizados para el proceso de optimización, caracterización y separación del hidrolizado enzimático. En el capítulo cinco se describieron los resultados y se realizó una discusión de los mismos. Las conclusiones obtenidas a partir del trabajo experimental se presentaron en el capítulo seis y en el capítulo siete se expusieron las recomendaciones hechas para trabajos posteriores sobre este mismo tema de tesis.

Se evaluó el grado de hidrólisis, nitrógeno recuperado y el perfil de los pesos moleculares del hidrolizado proteico de subproductos de carpa obtenido por medio de Flavourzyme (complejo comercial de exo y endopeptidasas). A través de un análisis de superficie de respuesta, de un análisis de nitrógeno recuperado por unidad enzimática, del perfil de pesos moleculares de las fracciones peptídicas obtenidas y del estudio de la actividad de Flavourzyme se optimizó el proceso de recuperación de proteína en las siguientes condiciones: pH 7, T=53°C, S:B=40% y E=50 LAPU/g.

Por medio de ultrafiltración se recuperaron dos fracciones peptídicas (1 a 10 kDa y > 10 kDa) con propiedades emulsificantes y alto contenido de aminoácidos esenciales. Se recuperó un 9.5% de nitrógeno en forma de péptidos mayores de 10 kDa con propiedades emulsificantes comparables a la de albúmina de huevo. La fracción entre 1 y 10 kDa presentó el mayor porcentaje de aminoácidos esenciales.

3. Hipótesis y Objetivos	28
4. Materiales y métodos	29
4.1 Sustrato	29
4.2 Enzimas	29
4.3 Reactivos	30
4.4 Caracterización de los subproductos de Carpa (SC)	30
4.4.1 Humedad	30
4.4.2 Proteína	30
4.4.3 Nitrógeno no proteico	31
4.5 Estandarización de técnicas para la determinación del grado de hidrólisis	31
4.5.1 Péptidos solubles en TCA 0.3 M	31
4.5.2 Grupos α -amino terminales	33
4.6 Evaluación de Flavourzyme y Alcalasa	33
4.6.1 Cinética de hidrólisis	33
4.6.2 Grado de hidrólisis	34
4.6.3 Nitrógeno recuperado	34
4.6.4 Perfil electroforético de pesos moleculares	35
4.6.5 Filtración en gel	35
4.7 Análisis de superficie de respuesta	36
4.8 Evaluación de actividad de Flavourzyme	37
4.9 Producción y análisis de dos fracciones peptídicas	38
4.9.1 Hidrólisis enzimática	38
4.9.2 Separación por ultrafiltración	38
4.9.3 Liofilización	39
4.9.4 Análisis de funcionalidad	39
4.9.4.1 Solubilidad	39
4.9.4.2 Capacidad de emulsión	39
4.9.4.3 Índice de actividad emulsificante	40

4.9.4.4	Índice de estabilidad de emulsión	41
4.9.5	Perfil de aminoácidos	42
5.	Resultados y discusión	43
5.1	Caracterización de los subproductos de Carpa (SC)	43
5.2	Estandarización de técnicas para la determinación del grado de hidrólisis	43
5.3	Evaluación de Flavourzyme y Alcalasa	46
5.3.1	Grado de hidrólisis	47
5.3.2	Nitrógeno recuperado	49
5.3.3	Perfil electroforético de pesos moleculares	50
5.4	Análisis estadístico de superficie de respuesta de Flavourzyme	53
5.4.1	Prueba de normalidad	54
5.4.2	Prueba de varianza y ajuste del modelo	55
5.4.3	Gráficas de contorno	57
5.4.4	Validación del análisis de superficie de respuesta	60
5.5	Evaluación de la actividad de Flavourzyme	64
5.6	Producción y análisis de dos fracciones peptídicas	67
5.6.1	Hidrólisis	68
5.6.2	Separación	69
5.6.3	Liofilización y balance de materia	73
5.6.4	Propiedades funcionales	74
5.6.4.1	Solubilidad	74
5.6.4.2	Capacidad de emulsión	74
5.6.4.3	Índice de actividad emulsificante	75
5.6.4.4	Estabilidad de emulsión	76
5.6.5	Perfil de aminoácidos	76
6.	Conclusiones	78
7.	Recomendaciones	79

8. Bibliografía

80

Anexos

88

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a los asesores de tesis la Dra. Arely Prado Barragán, el Dr. Sergio Huerta Ocha y el Dr. Ernesto Favela Torres por su guía a lo largo de tres años de trabajo en común. Por su tolerancia y paciencia.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo económico.

A los sinodales del exámen de grado la Dra. María de la Luz Reyes Vega, el Dr. Ramón Pacheco Aguilar y el Dr. Carlos Regalado González, por sus atinados comentarios y critica hacia el trabajo de tesis.

A mis compañeros de la planta piloto 4, a todos sin excepción, por su compañía, su apoyo, su amistad y su presencia.

Al centro Regional de Investigación Pesquera en Tampico, Tamaulipas por la donación del lote de subproductos de carpa utilizado en esta investigación.

DEDICATORIA

A la memoria de mi Padre, por darme la vida.

A mi Madre por su gran fortaleza, por su apoyo y amor incondicional.

A mis hermanos por contagiarme su entusiasmo.

A mi esposo Leonel por compartir conmigo mis proyectos.

A mi hijo Leonel André por traer consigo la felicidad.

A mi amigo Guillermo por su amistad.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Mermas y desechos de la Industria Pesquera para 1999.	3
5.1	Cinética de hidrólisis de caseína con Alcalasa 55°C, pH 9, 40% S:B y 60 AU/Kg.	44
5.2	Cinética de hidrólisis de subproductos de carpa (SC): (A) Alcalasa a 55°C, pH 9, 40% S:B y 60 AU/Kg. (B) Flavourzyme a 52°C, pH 6, 40% S:B y 50 LAPU/g.	47
5.3	Nitrógeno recuperado en una cinética de hidrólisis de SC con: (A) Alcalasa a 55°C, pH 9, 40% S:B y 60 AU/Kg. (B) Flavourzyme a 52°C, pH 6, 40% S:B y 50 LAPU/g.	49
5.4	Relación entre GH y NR durante 60 minutos de SC con: (A) Alcalasa a 55°C, pH 9, 40% S:B y 60 AU/Kg. (B) Flavourzyme a 52°C, pH 6, 40% S:B y 50 LAPU/g.	50
5.5	Patrones electroforéticos de las fracciones peptídicas durante la cinética de hidrólisis con Flavourzyme (F) y Alcalasa (A), método tradicional de SDS-PAGE.	51
5.6	Patrones electroforéticos de las fracciones peptídicas durante la cinética de hidrólisis con Flavourzyme (F) y Alcalasa (A), método modificado para péptidos de bajo peso molecular .	52
5.7	Distribución de frecuencias de la variable de respuesta (GH) en el ASR con Flavourzyme.	55
5.8	Gráfica de contorno de GH de SC con Flavourzyme en función de pH y T, S:B=25 % y E=80 LAPU/g.	57
5.9	Gráfica de contorno de GH de SC con Flavourzyme en función de E y S:B, T=53°C y pH=5.9.	58
5.10	Gráfica de contorno de GH de SC con Flavourzyme en función de T y S:B, E=80 LAPU/g y pH 5.9.	59
5.11	Gráfica de contorno de GH de SC con Flavourzyme en función de pH y S:B, E=80 LAPU/g T=53°C.	59

Índice de figuras

5.24	Cromatograma del retenido después de 16 horas de ultrafiltración en una membrana de 10 kDa.	70
5.25	Cromatograma del filtrado después de 16 horas de ultrafiltración en una membrana de 10 kDa.	71
5.26	Cromatograma del retenido y filtrado después de 20 horas de ultrafiltración en una membrana de 1 kDa.	72
1A	Curva estándar de Tirosina.	88
2A	Curva estándar de L-leucina.	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
2.1	Composición porcentual del pescado.	5
2.2	Composición de aminoácidos esenciales de diversos alimentos proteicos.	7
2.3	Contenido de proteína cruda en diferentes secciones del pescado.	8
2.4	Composición porcentual del Bacalao.	9
2.5	Composición de aminoácidos en el subproducto de Bacalao.	9
4.1	Codificación de las variables independientes para el ASR.	37
5.1.	Composición porcentual del SC y del músculo de carpa	43
5.2.	GH reportado con Alcalasa determinado por diversos métodos.	48
5.3	Valores de la variable respuesta del diseño experimental	54
5.4	Análisis de regresión.	55
5.5	GH teórico y experimental en función de S:B y E, pH=5.9, T=53°C.	60
5.6	Porcentaje de nitrógeno recuperado por unidad enzimática, después de 2 horas de hidrólisis de SC con Flavourzyme, pH=5.9, T=53°C a diferentes condiciones de S:B y E.	63
5.7	Balance de proteína de la hidrólisis de SC con Flavourzyme, pH=7, T=53°C, S:B=40%, E=50 LAPU/g, t = 15minutos.	73
5.8	Solubilidad de las fracciones peptídicas	74
5.9.	Capacidad de emulsión de las fracciones peptídicas	75
5.10.	Índice de actividad emulsificante de las fracciones peptídicas	75
5.11.	Estabilidad de emulsión de las fracciones peptídicas	76

5.12.	Composición porcentual de aminoácidos esenciales de las fracciones peptídicas recuperadas.	76
5.13.	Composición porcentual de aminoácidos esenciales en hidrolizados de sustratos de origen acuático.	77

1. INTRODUCCIÓN

La actividad pesquera en México, desde la captura de diferentes especies hasta su procesamiento o venta en fresco, produce descargas residuales tanto líquidas como sólidas. Las interacciones del sector pesquero con el medio ambiente son múltiples, por lo que el cuidado en la manipulación de los recursos pesqueros y sus subproductos son fundamentales para su aprovechamiento económico, así como en el marco del cuidado ambiental.

El gobierno de México, en su Programa Nacional de Pesca y Acuicultura 1995-2000, indica que la alternativa de desarrollo sustentable de los recursos pesqueros no sólo debe favorecer adecuaciones ecológicas, sino también tomar en cuenta los procesos socioeconómicos sectoriales en el manejo de tales recursos. Así, resultan elementos clave los instrumentos de ordenamiento ecológico y de evaluación de impacto ambiental.

El destino de la captura pesquera puede ser el consumo en fresco o la industrialización, la cual tiene como función incorporar un valor agregado a la materia prima y ofrecer productos pesqueros diversificados y de alta calidad al consumidor. El uso de las diferentes especies de pescado está limitado por su talla, estructura anatómica y propiedades sensoriales del músculo. Estas características determinan la capacidad de procesamiento y consumo de las mismas por parte de la industria pesquera.

En 1992, el rendimiento insumo/producto de la industria pesquera en el ámbito mundial fue del 48%. Lo que significa que un gran volumen de materia se pierde durante el proceso (lavados, fileteado, tratamientos térmicos, etc.) o se desecha en forma de vísceras, cabeza, huesos y tejido muscular (FAO, 1992).

El sistema de comercialización en fresco debe manipularse con rapidez y eficiencia ya que el pescado es un producto muy perecedero. De todos los alimentos de origen muscular, el pescado es el más sensible a la autólisis por sus propias enzimas; a la oxidación de grasas por su alto contenido en ácidos grasos insaturados, así como a la alteración microbiológica debido a la flora microbiana de su hábitat y porque tiene un pH menos ácido que favorece la multiplicación de las bacterias (Frazier y Westhoff, 1993). En nuestro país, las prácticas de comercialización de los productos pesqueros en fresco propician una baja calidad sanitaria. En general, el producto se traslada congelado a bodegas locales para su reembarque a las áreas de mercado, la forma predominante de transporte es a granel, a bordo de camiones en los que se alternan capas de hielo y pescado.

El inadecuado manejo del producto a lo largo de la cadena comercial propicia la existencia de una gran cantidad de mermas, que se estima puede llegar al 30% de la producción total mexicana (Programa de Pesca y Acuicultura, México 1995-2000).

Una vez en el centro de acopio para su venta en fresco, a consecuencia del devíscherado y fileteo del pescado, se desechan las vísceras, piel, cabeza, esqueleto, escamas y una porción considerable de tejido muscular unido a éstos. Dependiendo de la especie (atún, carpa, etc.) este subproducto puede representar hasta el 60% del peso total de pescado (Aitken y col. 1982).

En México, para 1999 se registraron 66,500 toneladas de desechos a partir de la industria del congelado y enlatado (Anuario estadístico de pesca, 1999) (figura 1). El destino de un gran volumen de subproductos no está registrado por las estadísticas oficiales, por lo que se deduce que gran parte de éstos son vertidos en basureros estatales o regresados al mar, por lo que representan un importante foco de contaminación ambiental.

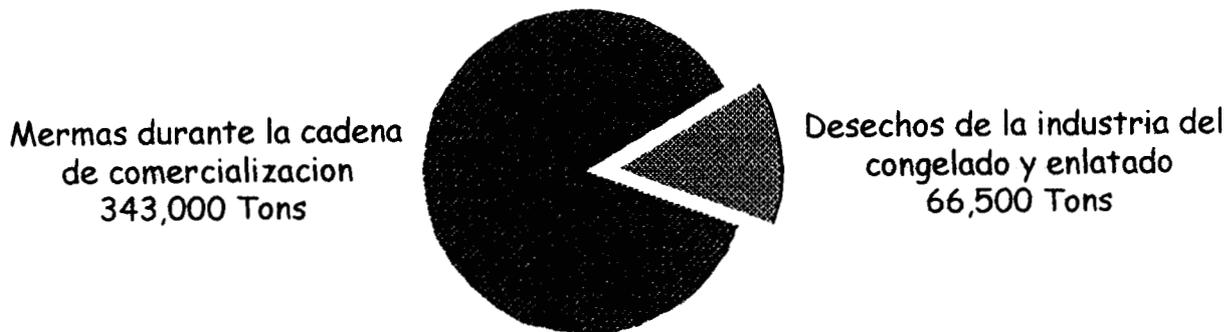


Figura 1. Merms y desechos de la Industria Pesquera para 1999.

El principal destino de estos subproductos es la producción de harina y aceite de pescado. En el proceso de fabricación de harina, debido a las altas temperaturas que se utilizan, se destruyen aminoácidos esenciales (lisina y alanina) y suele tener altos niveles de aminas biogénicas (histamina, cadaverina, putrescina, tiramina y mollerossina). Además, como insumo alimenticio para animales, el valor agregado del producto final es muy bajo (Hardy, 1990).

Una alternativa de aprovechamiento de estos subproductos pesqueros es la hidrólisis enzimática. Con la hidrólisis proteica de subproductos de la industria cárnica (Surowka y Fik, 1994; Linder y Fanni, 1995), y de especies de pescado baratas (Quaglia y Orban, 1987a, 1987b; Baca y col., 1991; Diniz y Martin, 1996; Hoyle y Merrit, 1994) y subproductos vertidos por la industria pesquera (Shahidi y Synowiecki, 1994; Baek y Cadwallader, 1995; Benjakul y Morrissey, 1997), se pretende recuperar y aprovechar una fuente de proteína de excelente calidad nutricional y funcional, que de otra forma es subutilizada o desechada inadecuadamente de manera que representa un foco de contaminación ambiental.

Es importante enfatizar que la harina de pescado proveniente de subproductos de pescado contiene entre 55-60% de proteína y 18-24% de cenizas, mientras que

en los hidrolizados enzimáticos proteicos estos valores son de 75-83 % y 4-13% respectivamente (Hardy, 1990). En estos últimos, el perfil de aminoácidos es similar al tejido muscular (Benjakul y Morrisey, 1997), lo que no sucede con la harina de pescado, ya que las altas temperaturas y compuestos químicos (solventes, ácidos y bases concentrados) utilizados durante el proceso causan la pérdida de aminoácidos esenciales (Hall y Ahmad, 1992).

Con la hidrólisis enzimática se puede recuperar fracciones peptídicas con propiedades nutricionales y funcionales atractivas para la industria alimentaria (Hall y Ahmad, 1992; Benjakul y Morrisey, 1997). Dependiendo de la enzima utilizada, la hidrólisis se realiza en condiciones neutras o alcalinas y a una temperatura promedio de 55°C, lo que minimiza la pérdida de aminoácidos. Además, durante el proceso no se vierten efluentes contaminantes.

Las proteasas comerciales más estudiadas en hidrolizados de pescado han sido la Alcalasa® y Neutrasa® (Quaglia y Orban, 1987a, 1987b; Hoyle y Merrit, 1994; Baek y Cadwallader, 1995; Shahidi y Synowiecki, 1995; Benjakul y Morrisey, 1997), ambas enzimas son endopeptidasas de amplio espectro. Con la Alcalasa se ha obtenido mayor extracción de proteína, mayor grado de hidrólisis y menor producción de péptidos amargos, éstos últimos producidos por la presencia de aminoácidos hidrófobicos en los extremos del péptido (Adler-Nissen, 1986). En la literatura ha sido poco reportado el uso de Flavourzyme®, complejo de enzimas proteolíticas con acción endo y exopeptidasas dependiendo del pH del medio, 5 y 7 respectivamente, por lo cual resulta de especial interés su estudio.

El objetivo de la presente tesis fue optimizar el proceso de hidrólisis enzimática de subproductos de carpa dorada (*Carassius auratus*) con Flavourzyme, para la recuperación de fracciones peptídicas con propiedades nutricionales y funcionales.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Proteínas del pescado

El contenido de proteína en el pescado depende de varios factores: la especie, el estado de nutrición, el ciclo reproductivo, la estación del año, entre otros. El promedio se encuentra en el rango de 15 a 20 % en base húmeda (tabla 2.1).

Tabla 2.1 Composición porcentual del pescado

	%
Agua	65-80
Proteínas	15-20
Lípidos	1-20
Minerales	Trazas
Vitaminas A, B, C y D	Trazas

(Sikorski, 1994)

El contenido de proteína en el pescado generalmente se calcula en términos de proteína cruda, valor que incluye a las proteínas sarcoplásmicas, miofibrilares y del estroma así como a los componentes nitrogenados no proteicos.

Las proteínas sarcoplásmicas pertenecen a una familia de proteínas que se caracterizan por ser solubles en agua o en soluciones salinas diluidas ($\mu @ = 0.06$), son fundamentalmente globulinas y albúminas pertenecientes a los sistemas que intervienen en el metabolismo celular (hemoproteínas, hemoglobina, mioglobina, hemocianinas y enzimas). El contenido en el pescado de dichas proteínas es mayor que en los animales terrestres (Brow, 1962). Las enzimas sarcoplásmicas más importantes en la tecnología de alimentos por su efecto en la calidad comestible del pescado son las hidrolasas, oxidoreductasas y transferasas (Haard, 1991).

Por su parte, las proteínas miofibrilares en el músculo de pescado representan entre 40-60% del total de proteínas (Sikorski, 1994). Son solubles en soluciones salinas de baja fuerza iónica ($\mu @ = 0.6$) y contienen cantidades importantes de aminoácidos esenciales. Se dividen en proteínas contráctiles (miosina y actina) y proteínas reguladoras de la contracción (tropomiosina, troponinas). La miosina (475 kDa) representa un 40% de las proteínas totales del músculo de pescado, mientras que la actina (41.7 kDa) constituye el 20%. En los mamíferos el contenido de dichas proteínas es de 27 y 11%, respectivamente. Cabe mencionar, que la miosina del pescado es más sensible a la desnaturalización (por calor-secado) y a la proteólisis que la miosina de mamíferos (Cheftel, 1989).

Las proteínas del estroma son las menos solubles del músculo. Esta fracción proteica contiene las proteínas del sarcolema, del retículo sarcoplasmático, membranas mitocondriales y las proteínas del tejido conectivo. El tejido conectivo contiene los fibroblastos, las fibras de colágeno, reticulina y elastina. El contenido de proteínas del estroma en el músculo de pescado representa entre 3 al 10%, mientras que en mamíferos este porcentaje alcanza el 16% (Cheftel, 1989). El colágeno (300 kDa) es el constituyente principal del tejido conectivo, se encuentra en los huesos, piel, músculo y sistema cardiovascular. La composición de aminoácidos del colágeno de pescado difiere del colágeno muscular de mamíferos en ser más rico en aminoácidos esenciales, además, la solubilidad del colágeno de pescado es significativamente mayor que la de los mamíferos. El contenido promedio de colágeno en el hueso, piel y músculo es de 25%, 50% y 2 %, respectivamente (Sikorski, 1994).

Los componentes nitrogenados no proteicos (NNP) más abundantes en el pescado son los aminoácidos libres, péptidos, guanidinas, urea, betaninas, nucleótidos y amonio cuaternario. En el tejido muscular blanco el NNP llega a ser entre un 9 y 15% del total de nitrógeno, por su parte, el porcentaje de aminoácidos libres está en el rango de 0.5 a 2% (Sikorski, 1994).

2.1.1. Calidad proteica

La calidad de una proteína alimenticia depende de la naturaleza y cantidad de aminoácidos esenciales, es decir aquellos aminoácidos que el organismo no puede producir y necesita ingerirlos en su dieta, para el ser humano son la valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptofano, lisina, treonina y metionina (Badui, 1994). En general, las proteínas de origen animal son de mejor calidad que las de cereales, ya que éstas últimas son pobres en lisina, triptofano y treonina. Asimismo, la calidad proteica del pescado es superior que la carne de res y la soya, debido a que el pescado presenta un mayor contenido de aminoácidos esenciales tales como valina y lisina (Cheftel, 1989, Frokjaer, 1994) (tabla 2.2).

Tabla 2.2. Composición de aminoácidos esenciales de diversos alimentos proteicos

Aminoácido (mg/g)	Pescado	Res	Soya	Norma FAO-OMS
Fenilalanina + tirosina	76	80	88	60
Isoleucina	48	48	50	40
Leucina	77	81	85	70
Lisina	91	89	70	55
Metionina +cisteína	40	40	28	35
Treonina	46	46	42	40
Triptófano	11	11	14	10
Valina	61	50	53	50
Total	450	445	430	360

FAO, OMS, 1974

Cuando las proteínas son ingeridas por el organismo, las proteasas digestivas se encargan de romper las largas cadenas peptídicas de proteínas en aminoácidos libres y cadenas de di ó tripéptidos, a este proceso se le conoce como digestión. Posteriormente, gracias a sistemas de transporte específicos, cada uno de estos productos es absorbido por el aparato digestivo e incorporado a la síntesis de

proteínas en los tejidos. Los aminoácidos de las proteínas animales se digieren y absorben en una proporción del 90%, mientras que los de algunas proteínas vegetales sólo pueden ser liberados y absorbidos en un 60 a 70%. A este respecto, la proteína de pescado muestra una digestibilidad mayor del 90% (Cheftel, 1989).

2.1.2. Proteínas de los subproductos de la industria pesquera

En la industria pesquera, alrededor de sólo el 25% del peso total del pescado es utilizado como filetes y el resto se desecha como subproducto (Piggott, 1986). A partir de éste subproducto se puede recuperar un 25% de músculo, tejido conectivo y piel utilizando procedimientos mecánicos de deshuesado. La cantidad y la calidad de proteína en el subproducto dependerá de la sección del cuerpo del pescado que se considere, ya que el contenido y el tipo de proteína varían de acuerdo a su ubicación anatómica (tabla 2.3).

Tabla 2.3. Contenido de proteína en diferentes partes del pescado

Componente	% ¹
Músculo	15-20
Huesos	10-21
Piel	19-33
Escamas	19-36
Vejigas de nado	18-37
Aletas	12-21

¹Base húmeda
(Zaitsev, 1969)

Por ejemplo, en la tabla 2.4 se presenta la composición porcentual del músculo de Bacalao y del subproducto del fileteado de Bacalao. Además de observarse una menor cantidad de proteína en el subproducto, la calidad de ésta es menor debido a una mayor presencia de colágeno; lo que provoca que aumente el

contenido de ciertos aminoácidos no esenciales como glicina, prolina e hidroxiprolina y disminuya la cantidad de aminoácidos esenciales (tabla 2.5).

Tabla 2.4. Composición porcentual del Bacalao

Componente (%)	Bacalao	Subproducto de Bacalao
Agua	81.2	77.6
Proteínas	18.8	14.3
Lípidos	0.6	3.7
Cenizas	1.1	1.9

(Adaptado por Shahidi y col., 1991, 1992)

Tabla 2.5. Composición de aminoácidos en el Bacalao

Aminoácido (mg/g)	Bacalao	Subproducto de Bacalao
Esenciales		
Fenilalanina + tirosina	7.28	5.54
Isoleucina	4.61	3.3
Leucina	8.13	6.18
Lisina	9.18	6.53
Metionina +cisteína	4.03	3.63
Treonina	4.39	4.15
Triptofano	1.12	1.01
Valina	5.15	3.8
No esenciales		
Alanina	4.8	6.82
Arginina	5.99	6.5
Acido aspartico	10.24	9.05
Glicina	6.05	11.72
Acido glutamico	14.92	12.56
Histidina	2.94	1.79
Hidroxiprolina	0.38	2.38
Prolina	3.54	5.57
Serina	4.08	5.35
Tasa de eficiencia proteica (PER)	2.9-2.99	2.31-2.33

(Adaptado por Shahidi y col., 1991, 1992)

En estudios recientes de hidrolizados enzimáticos de proteína a partir de subproductos que incluían cabeza, piel, hueso, vísceras y tejido muscular, se observó que el perfil de aminoácidos del hidrolizado era similar al del músculo de *Pacific Whiting*. Sin embargo, el hidrolizado contenía una menor cantidad de triptofano y ácido glutámico y una mayor cantidad de prolina y glicina, debido a que el subproducto contenía piel y tejido conectivo con diferente composición de aminoácidos que el músculo (Benjakul y Morrissey, 1997).

2.2. Hidrólisis enzimática de proteínas

La hidrólisis de proteínas es la degradación de las mismas en péptidos solubles de diversos tamaños y puede ser química ó enzimática.

En los hidrolizados químicos se emplean condiciones ácidas ó alcalinas drásticas (>100°C bajo presión). Durante la hidrólisis ácida (HCl 6N, 110°C, 24-72 horas) se pierden parcialmente algunos aminoácidos (lisina, serina, treonina y triptofano), mientras que en la hidrólisis alcalina resultan dañados ciertos aminoácidos (lisina, arginina, treonina, serina y cisteina) y puede producirse una fuerte racemización de aminoácidos residuales. Lo anterior favorece la formación de compuestos nefrotóxicos como la lisinoalanina (Cheftel, 1989) y neurotóxicos como lantionina y β -aminoalanina (Lahl y Grindstaff, 1989). Por lo cual el producto resultante presenta una disminución en el valor nutricional, además de que es necesaria la remoción de los compuestos químicos utilizados durante la hidrólisis.

La hidrólisis enzimática tiene varias ventajas sobre la hidrólisis química:

1. El perfil de aminoácidos del hidrolizado es igual al de la proteína original ya que se lleva a cabo a temperaturas entre 50 y 60°C y en condiciones neutras o

ligeramente alcalinas, por lo que los aminoácidos originales no son afectados durante el proceso (Cheftel, 1989).

2. No se producen reacciones de Maillard de producción de color y pérdida de lisina, ocasionadas por altas temperaturas (Cheftel, 1989).
3. Se puede separar fracciones peptídicas con propiedades nutricionales y funcionales, por medio de procesos de ultrafiltración, precipitación isoeléctrica y electrodiálisis (Nishikawa, 1983, Vega, 1987; Quaglia y Paoletti, 1988; Mahmoud, 1994).
4. Se pueden llevar a cabo procesos *in continuo* en reactores de membrana (Nakajima y col., 1992; Garem y col., 1992; Eyal y Bressler, 1993; Bohdziewicz, 1994; Lanl y Braun, 1994; Parham y Davis, 1995;).
5. Es una tecnología limpia ya que no utiliza solventes que se viertan al agua o al aire.

Por lo tanto, la hidrólisis enzimática de proteínas de pescado es un atractivo proceso alternativo para convertir los subproductos de la industria pesquera en productos con un mayor valor agregado, que poseen propiedades funcionales y alto valor nutricional (Mohr, 1978; Quaglia y Orban, 1987; Rebeca y col., 1991; Benjakul y Morrissey, 1997). La fracción insoluble que queda al final del proceso puede utilizarse como suplemento alimenticio y fertilizante (Mohr, 1978).

2.2.1. Proteasas

Las enzimas proteolíticas o proteasas hidrolizan los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y selectividad. En un proceso de hidrólisis se utilizará la enzima más adecuada de acuerdo a la necesidad de la transformación

requerida (Badui, 1994). Las proteasas se clasifican de acuerdo a su origen (animal, vegetal o microbiano), acción catalítica y naturaleza del sitio catalítico.

Por su acción catalítica, las proteasas se clasifican como endopeptidasas y exopeptidasas; las endopeptidasas rompen la cadena polipeptídica en puntos particulares distribuidos a lo largo de la cadena, mientras que las exopeptidasas liberan un aminoácido a la vez, de la terminal N (aminopeptidasa) o terminal C (carboxipeptidasa); (Adler-Nissen, 1993).

Dentro del catalogo enzimático (EC) todas las proteasas pertenecen a la subclase 3.4, la que a su vez se subdivide en 3.4.11-19 para las exopeptidasas y 3.4.21-24 para las endopeptidasas (Adler-Nissen, 1993)..

2.2.1.1. Endopeptidasas

Por su importancia, las cuatro principales clases de endopeptidasas son las serina-proteasas (EC 3.4.21), cisteina-proteasas (EC 3.4.22), aspártico-proteasas (EC 3.4.23) y las metaloproteasas (3.4.24). Como su nombre lo indica, en la serina, cisteina y aspártico proteasas se encuentra la serina, cisteina y ácido aspártico como una parte esencial del sitio catalítico. Alguna modificación o bloqueo de ese punto en la cadena produce una completa inactivación de la enzima.

Cada uno de estos grupos de enzimas tiene condiciones óptimas de acción, por ejemplo, las serina proteasas tienen una actividad máxima a pH alcalino, la cisteina proteasas a pH neutro y la aspártico proteasas a pH ácido. Esta especificidad la podemos encontrar en el organismo humano, por ejemplo, las enzimas proteolíticas digestivas presentan su máxima actividad de acuerdo con el pH del tracto digestivo (ácido en el estómago y alcalino en los intestinos) (Adler-Nissen, 1993)..

La especificidad de las endoproteasas es considerada en términos de los dos aminoácidos que forman el enlace peptídico y que es susceptible a la hidrólisis por la enzima en cuestión. Dependiendo del mecanismo de catálisis, la especificidad está asociada con el lado carboxilo, amino o ambos lados de la cadena. Un ejemplo de especificidad es la tripsina (serina-proteasa) que rompe todos los enlaces peptídicos con lisina o arginina en el lado del carboxilo (Adler-Nissen, 1993). Por su parte, la Alcalasa (serina-proteasa) presenta un amplio rango de especificidad hidrolizando varios tipos de enlaces peptídicos y algunos enlaces éster, preferentemente los que contienen residuos de aminoácidos aromáticos. Por su sitio activo, la Alcalasa tiene una mayor afinidad por aminoácidos hidrofóbicos (Ward, 1983).

2.2.1.2. Exopeptidasas

Las aminopeptidasas (EC 3.4.11) son abundantes en la naturaleza ya que se localizan intracelularmente o unidas a la membrana celular, sin embargo, es difícil encontrarlas en preparaciones comerciales. Por ejemplo, la preparación enzimática Pronase® (aislada de *Streptomyces griseus*) contiene aminopeptidasas y carboxilasas, pero su costo es muy alto como para utilizarse en la industria alimentaria. Además, algunos extractos de tejido animal han sido empleados industrialmente como fuente de actividad aminopeptidasa (Clegg y col., 1978).

Por su parte, las carboxipeptidasas se dividen de acuerdo a la naturaleza del sitio catalítico en serina-carboxipeptidasa (EC 3.4.16), metalocarboxipeptidasas (EC 3.4.17) y cisteína-carboxipeptidasa (EC 3.4.18). Muchas proteasas comerciales, en particular de origen fúngico, contienen apreciables cantidades de carboxipeptidasas (Adler-Nissen, 1993).

Por lo que respecta al mecanismo hidrolítico de las exopeptidasas, éste es similar al de las endopeptidasas dependiendo si pertenece a la clase de las serina o a las metaloenzimas (Adler-Nissen, 1993).

2.2.1.3. pH y temperatura de actividad y estabilidad

Las presentaciones comerciales de enzimas, generalmente proporcionan información sobre el pH y temperatura de actividad, así como el pH y temperatura de estabilidad (pH 5-8, T=40-60°C para Flavourzyme), esta información es presentada mediante curvas. Por ejemplo, las curvas de estabilidad muestran la actividad residual después de la exposición a un rango de valores de pH y temperatura durante un periodo definido de tiempo.

Sobre la base del pH de actividad óptima es usual clasificar las proteasas como alcalinas, neutras o ácidas, esta clasificación no es rigurosa y se sugiere la comprobación del pH óptimo por medio de trabajo experimental. Por ejemplo, la metaloproteasa Neutrasa se clasifica como proteasa neutra y la serina-proteasa Alcalasa es considerada alcalina, de acuerdo al pH de máxima actividad (Adler-Nissen, 1993).

Una importante consideración es que las curvas de pH-actividad muestran la actividad relativa inicial bajo condiciones de ensayo en cierto sustrato y estas varían con las características de la proteína. Por ejemplo, el pH óptimo de actividad de la papaína sobre gelatina es de 5, mientras que sobre albúmina y caseína es de 7 (Yamamoto, 1975).

Por su parte, las curvas de pH-estabilidad se utilizan para elegir las mejores condiciones de hidrólisis. En ciertos casos una proteasa es muy estable en un valor de pH al cual no hay actividad, un caso típico de esta situación se da con la tripsina, la cual tienen una gran estabilidad a pH 3 y su actividad máxima se da a pH 7-9. En otros casos, la exposición a valores extremos puede causar que la molécula de la enzima se despliegue lo que incrementa la posibilidad de degradación proteolítica,

de esta forma, la proteasa se inactiva rápidamente por una reacción autolítica, este fenómeno se observa con la Alcalasa a un pH ácido (Ottesen y Svendsen, 1970).

La posibilidad de inactivación de proteasas a valores extremos de pH es, en algunos casos, una gran ventaja ya que el cambio de pH puede llevarse a cabo rápidamente cuando se desea terminar la reacción de hidrólisis. Igualmente, con altas temperaturas la inactivación térmica de la enzima es pronunciada (Novo Inc., 1982).

2.2.1.4. Aplicaciones

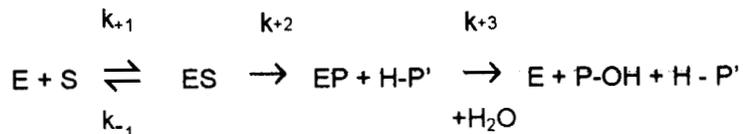
Las endopeptidasas son las proteasas más utilizadas en la industria alimentaria debido a la hidrólisis extensiva que producen, aunque en ocasiones su acción se complementa con exopeptidasas con el fin de eliminar aminoácidos hidrófobos de los extremos N y C, que producen el sabor amargo en los hidrolizados proteicos (Adler-Nissen, 1993; Noboru y Tokoyasu, 1997). Las aminopeptidasas (Clegg y col, 1978; Minagawa, 1989) y las carboxipeptidasas (Umetsu y col., 1983; Noboru, 1997).

Las proteasas comerciales más estudiadas en hidrolizados de pescado y crustáceos han sido la Alcalasa y Neutrasa. Ambas enzimas son endopeptidasas de amplio espectro, sin embargo, con la Alcalasa se ha obtenido un mayor porcentaje de recuperación de nitrógeno, mayor grado de hidrólisis y un perfil de pesos moleculares menor (Quaglia y Orban, 1987a, 1987b; Hoyle y Merrit, 1994; Baek y Cadwallader, 1995; Diniz y Martin, 1996; Benjakul y Morrissey, 1997).

2.2.2. Mecanismo de hidrólisis

Las enzimas proteolíticas o proteasas hidrolizan los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y selectividad. El mecanismo de catálisis en la

mayoría de las proteasas ocurre secuencialmente: 1) formación del complejo de Michaelis entre el sustrato y la enzima, 2) rompimiento del enlace peptídico y 3) la liberación de la enzima (Adler-Nissen, 1993).



donde S es el sustrato, P y P' son los péptidos resultantes

Durante el proceso de reacción proteolítica, el pH cambiará, excepto en la región de 5.0-6.0 donde la captura y liberación de protones está en equilibrio. A pH menor a 3.1-3.6 el grupo carboxílico estará más del 50% disociado y el grupo amino completamente protonado; presentándose una captura de 0.5 a 1.0 equivalentes de H⁺ por cada equivalente de enlaces peptídicos rotos, incrementando el pH si éste no es controlado. Si el pH es superior a 7.5-7.8, el grupo amino estará menos del 50% protonado y el carboxílico completamente disociado, liberándose de 0.5 a 1.0 equivalentes de H⁺, disminuyendo en consecuencia el pH si éste no es controlado. De modo que, si se quiere realizar una hidrólisis a pH constante, deberá adicionarse ácido o base para titular los grupos carboxilo o amino liberados.

Durante las condiciones típicas de los procesos de hidrólisis de proteínas alimentarias, la saturación de sustrato prevalece durante todo el curso de la reacción; los péptidos resultantes del primer ataque de la proteasa sobre la molécula de proteína actúan posteriormente como sustrato para siguientes degradaciones a péptidos más pequeños. Este proceso da como resultado una competencia de sustratos entre la proteína original y los péptidos formados (Adler-Nissen, 1986).

La velocidad de la reacción disminuye con el tiempo y termina cuando no existen más enlaces peptídicos para la enzima. El grado de hidrólisis máximo que se puede obtener depende de la proteína y la especificidad de la enzima, además, el

tiempo de reacción para obtener cierto grado de hidrólisis puede reducirse aumentando la concentración de la enzima (Novo Inc., 1982).

Es importante mencionar que la velocidad a la que una enzima rompe diversos enlaces peptídicos es diferente en cada sustrato. Por ejemplo, la quimosina (aspártico-proteasa) en leche hidroliza rápidamente el enlace Fen-105-Met-106, mientras que con otros sustratos exhibe una capacidad proteolítica ordinaria (Adler-Nissen, 1993).

Se sabe que muchas proteínas son más fácilmente hidrolizables si previamente han sido desnaturalizadas, debido a que la desnaturalización implica un desenvolvimiento de las cadenas polipeptídicas de su particular estructura terciaria a un estado abierto y menos definido, lo que significa que si en su estado nativo muchos enlaces peptídicos estaban ocultos en el interior de la estructura terciaria, con la desnaturalización estos enlaces peptídicos son expuestos y viables para el ataque enzimático. Lo anterior explica cualitativamente el incremento de la velocidad de hidrólisis en una proteína desnaturalizada (Linderstrom-Lang, 1952).

2.2.3. Optimización de las condiciones de hidrólisis

Las variables de control más importantes en la reacción enzimática son: temperatura, pH, la naturaleza de la proteína utilizada como sustrato, actividad específica y concentración de enzima (Adler-Nissen, 1986).

La elección adecuada de la proteasa para una hidrólisis en particular requiere de una investigación sistemática, donde deben ser estudiadas las condiciones óptimas de acción de la proteasa sobre el sustrato. Además, se debe tomar en cuenta su accesibilidad comercial, bajo costo, especificidad en el rompimiento de enlaces peptídicos y las características del sustrato. Por ejemplo, el tejido muscular de pescado se caracteriza por ser rico en compuestos nitrogenados, reflejado en un

pH *postmortem* mayor de 5.5 (Frazier y Westhoff, 1993), provocado por la transformación del glucógeno muscular en ácido láctico. Por lo tanto, sería deseable llevar la hidrólisis sin ajustes drásticos de pH, esto se logra con proteasas cuya actividad proteolítica se da en condiciones neutras o ligeramente alcalinas

Para la optimización de las condiciones de una reacción de hidrólisis, es necesario definir el efecto de las variables de control sobre las variables de respuesta del proceso: porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados o Grado de Hidrólisis (GH), cantidad de hidrolizado obtenido o porcentaje de Nitrógeno Recuperado (NR) y el Perfil de Pesos Moleculares de las fracciones peptídicas obtenidas (PPM).

Las funciones que relacionan GH, NR y PPM dependen de la proteasa utilizada. Por lo general, a mayor grado de hidrólisis corresponde un mayor porcentaje de nitrógeno recuperado y un menor perfil de pesos moleculares de las fracciones peptídicas resultantes (Adler-Nissen, 1993). La caracterización de las fracciones peptídicas resultantes de la hidrólisis enzimática, se puede llevar a cabo por técnicas de electroforesis y filtración en gel.

A través de un análisis de superficie de respuesta (ASR) se puede obtener una función que describa el comportamiento y el efecto de cada una de las variables de control (pH, T, relación sustrato:buffer, concentración de enzima) sobre el grado de hidrólisis, con lo que se podrá predecir el comportamiento de este parámetro conforme cambien las condiciones del proceso. El ASR ha sido aplicado para la optimización de operaciones en la industria alimentaria (Thompson, 1982; Joglekar y May, 1987; Floros y Chinnan, 1988; Garrote y col., 1993, 1994) y en el análisis de hidrólisis proteicas (Linder y Fanni, 1995; Diniz y Martin, 1996; Baek y Cadwallader, 1995).

2.2.3.1. Análisis estadístico de superficie de respuesta (ASR)

El ASR es un conjunto de diseños estadísticos y técnicas de análisis, para estudiar el efecto de un conjunto de variables sobre una variable respuesta y la relación que existe entre ellas postulando un modelo matemático (Myers, 1971; Box y col., 1978).

El primer paso es definir las variables y el rango de valores que se van a estudiar, esta información suele obtenerse de la literatura o de experimentación previa. Posteriormente, se lleva a cabo el diseño experimental y por medio de un análisis de regresión múltiple, se determina cual de las variables afecta la respuesta media mostrando efectos significativos en la región experimental. Por último, se presentan los resultados en forma de gráficas de contorno.

El éxito del ASR depende de la aproximación de la función por un polinomio de bajo grado en la región experimental, ya que la ecuación generada es válida solamente dentro de los rangos de las variables de estudio.

El diseño de composición central utiliza diseños factoriales de varios niveles contruidos como bloques. El bloqueo puede ser útil para controlar ciertos factores externos que podrían de otro modo causar un incremento en el estimador de la variabilidad de la respuesta, lo cual puede ser útil en el caso de sustratos muy heterogéneos como lo son los subproducto de pescado.

Dos propiedades importantes en estos diseños son la rotabilidad y ortogonalidad, las cuales se definen a partir de los niveles $\pm \alpha$ de cada una de las variables del diseño y mejoran la predicción del modelo.

La rotabilidad es la propiedad del diseño que hace que la varianza de la respuesta predicha sea igual para cualquier distancia radial del centro del diseño y

no dependa de la dirección del punto al centro. Por lo tanto, no importa como esté orientada la verdadera respuesta, la información se obtiene simétricamente acerca del origen cuando se usa un diseño rotable, esto es importante para la predicción.

Por su parte, si un diseño es bloqueado con ortogonalidad en mente, entonces la estimación de los coeficientes del modelo no es afectada por diferencias en la respuesta asociadas con los bloques, excepto para el término constante, en otras palabras, la ecuación se puede usarse tal y como se obtiene en el análisis, y los efectos de factores de bloques pueden ser ignorados (Vargas, 1989).

La ortogonalidad al igual que la rotabilidad, depende del número de puntos del diseño en el bloque factorial. Tanto para rotabilidad y ortogonalidad existe una ecuación que determina α , para un diseño con ambas características α debe ser el mismo (Vargas, 1989).

2.3. Hidrolizados proteicos

Con un adecuado control del proceso de hidrólisis se puede reducir la producción de sabores amargos y obtener tamaños de péptidos con propiedades nutricionales y funcionales atractivas para el mercado. Las principales características sensoriales y fisicoquímicas que debe tener un hidrolizado proteico son: ausencia de péptidos amargos, presentar un patrón de pesos moleculares acorde a su destino comercial y propiedades funcionales adecuadas que permitan utilizarlo como suplemento proteico (Mahmoud, 1994).

2.3.1. Sabores amargos

Un fenómeno ampliamente analizado en los hidrolizados proteicos es la presencia de sabores amargos generados por péptidos de cadena corta que poseen un alto contenido de aminoácidos hidrófobos (Adler-Nissen, 1986).

En 1971, Ney formula la llamada regla Q que establece que los péptidos serían amargos si la hidrofobicidad promedio (Q) es alrededor de +1400 cal/mol, en cambio, no presentaría sabor amargo si Q es menor de + 1300 cal/mol. La regla Q y correlaciones similares basadas en el promedio de hidrofobicidad calculada han sido aceptadas y verificadas para péptidos pequeños individuales. Sin embargo, no se cumple para hidrolizados proteicos, ya que estos consisten de péptidos que muestran una amplia distribución de promedio de hidrofobicidad (Adler-Nissen, 1986).

El sabor amargo se produce por la interacción de las partes hidrofóbicas de los péptidos con los receptores de la lengua. En las proteínas intactas las regiones hidrofóbicas se encuentran en el interior de la molécula, pero cuando la molécula es degradada en pequeños péptidos, dichas regiones son expuestas al exterior y se provoca un sabor amargo. Un aminoácido hidrofóbico produce un mayor sabor amargo cuando se ubica en el interior del péptido, que cuando está en una posición terminal o cuando se encuentra libre. Por lo anterior, a valores muy altos de GH donde se producen péptidos de muy bajo peso molecular y aminoácidos libres, el sabor amargo disminuye (Adler-Nissen, 1978; Novo, 1986).

El grado de amargor en un hidrolizado proteico puede ser influenciado por las siguientes variables (Matoba y Hata, 1972; Adler-Nissen, 1984; Cheftel, 1989; Lahl y Braw, 1994):

1. La hidrofobicidad del sustrato, los hidrolizados ricos en prolina presentan un mayor sabor amargo.
2. El grado de hidrólisis que determina la longitud de los péptidos resultantes.

3. La enzima, que en combinación con el GH, influye en la distribución de la hidrofobicidad de los péptidos.
4. Alguna etapa adicional de remoción de péptidos amargos. Este proceso puede ser por precipitación isoeléctrica o por filtración en columnas de intercambio iónico (Aaubes-Dufau y Seris, 1995; Lee y Warthesen, 1996; Stevenson y col., 1998).
5. Adición de compuestos enmascarantes de sabor amargo. Comúnmente son ácidos orgánicos como cítrico y málico.

Noboru y col (1997), trataron los hidrolizados proteicos amargos de caseína y soya con aminopeptidasas producidas por *Aeromonas caviae* T-64 y se observó una marcada disminución del sabor amargo con un incremento en la cantidad de aminoácidos libres. Los aminoácidos hidrofóbicos como valina, isoleucina, leucina, tirosina y fenilalanina formaban el 76% de aminoácidos libres liberados por la aminopeptidasa, lo que sugiere que esta enzima hidroliza los péptidos amargos que presentan aminoácidos hidrofóbicos en su terminal N y que el amargor se reduce por la remoción de estos aminoácidos.

A partir de la composición de aminoácidos de una proteína se puede predecir la tendencia al amargor. Por ejemplo, la caseína, la hemoglobina y la proteína del maíz tienen una alta predisposición a producir hidrolizados con sabor amargo; mientras que los hidrolizados de carne, pescado y gelatina son bajos en amargor (Novo, 1986).

2.3.2. Propiedades funcionales

La funcionalidad de un hidrolizado proteico depende de las propiedades fisicoquímicas de sus péptidos, impartidas por su peso molecular, composición de

aminoácidos, estructura, carga y reactividad. Estas características determinan su solubilidad, la capacidad de emulsificación, gelificación, retención de agua, formación de espuma y propiedades organolépticas. Estos aspectos definen la naturaleza del alimento final al cual se podrá adicionar el hidrolizado (Hall, 1992).

La solubilidad es una propiedad funcional importante ya que la emulsificación, gelificación, etc., son afectadas por ésta (Wilding y col., 1984; Kretzschmar, 1992). La solubilidad depende del peso molecular, la secuencia de aminoácidos, la conformación y asociación entre las moléculas y la relación de grupos hidrofóbicos en la proteína (Borderías y Montero, 1988).

Una hidrólisis excesiva produce péptidos muy pequeños y aminoácidos libres que son solubles pero carecen de otra propiedad funcional. En contraste, péptidos de cadena larga pueden no ser lo suficientemente solubles para tener propiedades funcionales; por lo tanto, la solubilidad de las fracciones peptídicas es siempre un prerrequisito de la funcionalidad (Hall y Ahmad, 1992).

El pH juega un papel muy importante en la solubilidad del hidrolizado. Quaglia y Orban (1990) reportaron que en los hidrolizados de proteína producidos a partir de sardina, un GH del 20% tiene una solubilidad mayor del 90% en un rango de pH 2-9; mientras que un GH del 5% presenta una solubilidad del 56% a pH 2 y se incrementa a 95% a un pH de 5-9.

Por otra parte, los factores que afectan las propiedades de emulsificación son la velocidad de adsorción en la interfase aceite/agua, la cantidad de proteína absorbida, la extensión de la reducción en la tensión interfasial y la formación de una película cohesiva (Damodaran, 1994). Para poder funcionar como un emulsificante ideal, las proteínas deben poseer varias propiedades: alta hidrofobicidad superficial, tendencia limitada a agregación proteica, suficiente hidrofobicidad para asegurar la

solubilidad sobre un rango amplio de pH, alta capacidad de adsorción y capacidad para abatir la tensión interfacial, entre otras (Das y Kinsella, 1990).

Asimismo, la capacidad de emulsificación del hidrolizado proteico depende del pH debido al efecto que tiene éste sobre su solubilidad. En todos los valores de pH, los hidrolizados con un GH bajo son mejores agentes emulsificante que las que tienen GH altos. Con un GH del 5% la capacidad de emulsificación es en promedio de 146 ml aceite/400 mg de proteína, pero con un GH del 20% es de 88 ml de aceite/400 mg de proteína (Quaglia y Orban, 1990).

2.3.3. Propiedades nutricionales

El efecto del grado de hidrólisis sobre la antigenicidad ha sido estudiado en proteínas del suero (Asseliny col., 1989) y caseína (Cordle y col., 1991). Clemente y col. (1999) reportaron la producción de un hidrolizado proteico hipoalergénico a partir de garbanzo, en el cual con una hidrólisis sucesiva de Alcalasa y Flavourzyme se logró un grado de hidrólisis del 34% y una disminución de la actividad antigénica de más del 90%.

En los hidrolizados proteicos de caseína para fórmulas hipoalergénicas infantiles se busca que menos del 20% del producto final sean aminoácidos libres y el resto sean péptidos con 15 aminoácidos como máximo (Siemensma, 1993). Lo anterior se debe a que un alto contenido de aminoácidos libres puede alterar los tiempos de absorción y residencia de los aminoácidos en el plasma sanguíneo; se provocan tasas más rápidas de desaminación y catabolismo de aminoácidos, con lo que se reduce el aprovechamiento del nitrógeno contenido en la dieta. Además, aumenta la osmolaridad en el estómago y se provocan diarreas (Webb, 1990; Hardy, 1992).

Por su parte, para suplementos nutricionales de adultos se utilizan hidrolizados con pequeñas cantidades de aminoácidos libres y una proporción mayor de péptidos de cadena mediana mayores de 5 KDa (Mahmoud, 1994).

En humanos y mamíferos los sistemas de absorción de aminoácidos y péptidos son independientes, el sistema de péptidos favorece la absorción y transporte de di y tripéptidos y la presión osmótica provocada por péptidos es menor que la de aminoácidos libres (Freitas, 1993; Webb, 1990). Por lo tanto, debido a que los péptidos son menos hipertónicos que las mezclas de aminoácidos, se han utilizado como fuente de nitrógeno en alimentación enteral mejorando la eficiencia de absorción de aminoácidos y reduciendo los problemas osmóticos (Clegg y McMillan, 1974; Parker y Pawlett, 1986; Brinson y col., 1989; Minami y col., 1992; Garbutt, 1993; Siemmensma y col., 1993; Mahmoud, 1994).

2.3.4. Hidrolizados proteicos comerciales

Por su capacidad de espumado, emulsificación y solubilidad los hidrolizados de proteína de pescado se han utilizado como sustituto de albúmina de huevo en helados, galletas y postres (Miller y Groninger, 1976; Ostrander y col., 1977). Se ha reportado que péptidos de cadena corta producidos por la hidrólisis con Alcalasa y separados por ultrafiltración, tienen una gran capacidad de formación de espuma parecida a la que presenta la clara de huevo (Panyam y Kilara, 1996).

Por otra parte, péptidos con una secuencia específica de aminoácidos (Val-Tri-Pr y Val-Tre-Leu) se han utilizado para prevenir hipertensión y arteriosclerosis (Kagawa y col., 1994). Otros usos de los hidrolizados de proteína han sido en medios de cultivo de microorganismos, como fertilizantes, como sustrato en procesos fermentativos, como estabilizantes de vacunas, en productos veterinarios y en cosmetología (Hall, 1992; Mahmoud, 1994; Linder, 1996; Panyam, 1996; Batista y Nunes, 1997). Por ejemplo, con la hidrólisis enzimática de Macarela se producen

fracciones peptídicas con un peso molecular de 0.6 a 10 kDa, que se pueden utilizar en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria (Nouchi y col., 1994).

Por último, las soluciones de aminoácidos a partir de hidrolizados de proteína son utilizadas como fertilizantes, sazonadores de alimentos, con capacidad de impartir sabor, color y viscosidad (Nishikawa, 1983,1985; Iguchi y Sugita, 1992; Loosen y col., 1994).

En el mercado de la industria alimentaria en los Estados Unidos, se comercializa un concentrado de hidrolizado de proteína con un perfil de pesos moleculares de 1.5 a 4 kDa, con propiedades funcionales y nutricionales. Dicho hidrolizado lo produce la compañía Protein Recovery .

2.4. Separación de fracciones peptídicas

2.4.1. Ultrafiltración

En procesos de hidrólisis enzimática, el fraccionamiento por ultrafiltración permite la separación de péptidos por rango de peso molecular, con propiedades nutricionales y funcionales específicas (Vega, 1987; Quaglia y Paoletti, 1988). Además, es posible recuperar la enzima por ultrafiltración y llevar a cabo procesos *in continuo* en reactores de membrana (Lani y Braun, 1994; Nakajima y col., 1992).

La separación de fracciones peptídicas por ultrafiltración (UF) en los hidrolizados se ha estudiado desde los años 70. Un proceso de este tipo se realizó con una membrana con un corte de 10 kDa, con el objetivo de retener la enzima dentro del reactor y extraer los péptidos producidos a partir de la hidrólisis enzimática de subproductos de pescado, no obstante, el crecimiento bacteriano en la membrana no permitió continuar el experimento después de 4 días (Cheftel y col., 1970, 1972).

En trabajos posteriores, Quaglia y Paoletti (1988) mencionan el uso de diafiltración acoplado con ultrafiltración para remover péptidos pequeños y sales de hidrolizados de proteínas de sardina. Por su parte, Jaouen y col. (1990) utilizaron membranas para la recuperación de proteínas presentes en las aguas de lavado de fábricas de surimi.

En procesos de hidrólisis enzimáticas, se ha utilizado la ultrafiltración como un paso previo ó posterior a una operación de concentración o purificación (electrodiálisis, ósmosis inversa, evaporación al vacío) (Nishikawa, 1983; Yamamoto, 1983). Por ejemplo, en hidrolizados proteicos para uso terapéutico, se utiliza ultrafiltración y ósmosis inversa para eliminar aminoácidos libres y péptidos de bajo peso molecular (Kagawa y col., 1994).

Lossen y col. (1994) patentaron un proceso por lotes para la obtención de hidrolizados enzimáticos a partir de varios sustratos proteicos, en el cual después de la inactivación de la enzima se realiza un proceso de centrifugación y ultrafiltración obteniéndose un producto final rico en di y tripéptidos. Para la separación de fracciones peptídicas constituidas principalmente de di y tripéptidos, se ha utilizado la ultrafiltración con membranas de corte de 1 y 10 kDa (Nishikawa, 1983, 1985; Iguchi y Sugita, 1992; Nakajima y col., 1992).

2.4.2. Otros métodos

La separación de péptidos puede realizarse también por medio de técnicas como la precipitación isoeléctrica, filtración en columnas de intercambio iónico y ósmosis inversa (Aaubes-Dufau y Seris, 1995; Lee y Warthesen, 1996; Stevenson y col., 1998).

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

Optimizando las condiciones de hidrólisis enzimática de subproductos de Carpa Dorada (*Carassius auratus*) con Flavourzyme, se podrá recuperar fracciones peptídicas con propiedades funcionales y nutricionales.

Objetivo General

Optimizar el proceso de hidrólisis enzimática de subproductos de Carpa Dorada (*Carassius auratus*) con Flavourzyme® (complejo comercial de exo y endopeptidasas) para la recuperación de fracciones peptídicas con propiedades nutricionales y funcionales.

Objetivos Específicos

- ✓ Evaluar la actividad proteolítica de Flavourzyme® y Alcalasa® (endopeptidasa) con base en el porcentaje de nitrógeno recuperado, grado de hidrólisis y perfil de pesos moleculares.
- ✓ Establecer a través de un Análisis de Superficie de Respuesta un modelo matemático que maximice el grado de hidrólisis producido por Flavourzyme en función de la temperatura, pH, relación sustrato/buffer y concentración de enzima.
- ✓ Obtener las condiciones de hidrólisis donde se obtenga la mayor recuperación de nitrógeno, en forma de fracciones peptídicas con una amplia distribución de pesos moleculares y con propiedades funcionales y nutricionales.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Sustrato

El Centro de Investigación Pesquera unidad Tampico, Tamaulipas, donó un lote de 15 Kg de subproductos sólidos de Carpa Dorada (*Carassius auratus*), originados del fileteo de Carpa (pescada en río Tamezi y laguna Champallan) y constituidos principalmente de esqueleto y músculo adherido. Los subproductos se transportaron congelados por vía aérea y se trituraron, homogeneizaron y empacaron al vacío en bolsas de polietileno en lotes de 250 g para posteriormente almacenarse a -20°C hasta su uso.

4.2. Enzimas

Las enzimas utilizadas en el presente trabajo son de la compañía Novo y fueron donadas por Industrias Serma:

- a) Alcalasa®, es una endopeptidasa de origen bacteriano (*Bacillus licheniformis*), tiene una actividad específica de 3 AU/g (Anon., 1988). Una unidad Anson (Au) es la cantidad de enzima que hidroliza hemoglobina, a una tasa inicial que produce una cantidad de péptidos solubles igual a 1 meq de tirosina liberada por minuto (Novo). Su óptimo de actividad enzimática ocurre en un rango de pH de 8-10 y temperatura de 50 - 60°C.

- b) Flavourzyme®, es un complejo de proteasas de origen fúngico con acción endo y exopeptidasa dependiendo del pH del medio, tiene una actividad de 1000 LAPU. Una unidad de Leucina aminopeptidasa (LAPU) es la cantidad de enzima que hidroliza un μmol de L-leucina-p-nitroanilida por minuto (Novo). Las condiciones de mayor actividad se dan en un pH de 5.5 – 6.5 y temperatura de 50 - 55°C.

4.3. Reactivos

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron adquiridos de Sigma[®], excepto los de electroforesis (Bio-Rad[®])

4.4. Caracterización de los subproductos de Carpa (SC)

4.4.1. Humedad

La humedad se determinó mediante diferencia de peso (Egan y col., 1993). El procedimiento fue el siguiente:

- a) Se pesaron 2.5 g de SC (P_i).
- b) Se expuso a una temperatura promedio de 120°C hasta peso constante (P_s), en una termobalanza (Ohaus[®], modelo 610). El tiempo de exposición fue de aproximadamente 20 minutos.
- c) El porcentaje de humedad en la muestra se definió como:

$$\% \text{ Humedad} = (P_i - P_s) / P_i \times 100.$$

4.4.2. Proteína

La cuantificación de proteína se realizó a partir de la determinación del nitrógeno total (N_t), por medio de un analizador de carbono/nitrógeno/hidrógeno (CHNS/O analyzer 2400, Perkin Elmer). Se utilizó un factor de conversión de nitrógeno a proteína de 6.25, correspondiente al músculo de pescado (Egan y col., 1993).

$$\% \text{ Proteína total} = \% N_t \times 6.25$$

4.4.3. Nitrógeno no proteico

Para la determinación del nitrógeno no proteico (NNP) en el SC se utilizó el método de Lees (1985). El procedimiento se presenta a continuación:

- a) Se determinó el nitrógeno total (N_t) contenido en 5 g de SC.
- b) Una muestra de 5 g de SC se suspendió en una solución de TCA al 50% con el fin de precipitar las proteínas presentes en el SC.
- c) La suspensión se centrifugó a 6 500 x g por 15 minutos.
- d) Se cuantificó el N_s presente en el sobrenadante.
- e) El porcentaje de NNP se definió como:

$$\% \text{ Nitrógeno no proteico} = N_s / N_t \times 100.$$

4.5. Estandarización de técnicas para la determinación de grado de hidrólisis (GH)

Para la hidrólisis enzimática se utilizó caseína al 1% como sustrato y Alcalasa a las condiciones de máxima actividad según el proveedor de la enzima. La cinética de hidrólisis se llevó a cabo como sigue:

- a) En un reactor con temperatura controlada a 55°C y en agitación constante, se colocaron 100 mL de una solución de caseína al 1%.
- b) El pH se ajustó a 9 con NaOH 6N y se monitoreó durante toda la cinética con un potenciómetro Conductronic®.
- c) Se adicionó Alcalasa en una concentración de 2% enzima/sustrato (Novo Inc.).
- d) En caso necesario se ajustó el pH a 9 con NaOH 6N y HCl 6N.
- e) A los tiempos 0, 5, 10, 20, 30, 40, 70, 90 y 100 minutos se tomaron por duplicado alícuotas y se determinó el GH por dos métodos: el primero con base en la

227613

cuantificación de los péptidos solubles en TCA 0.3 M (Baek y Cadwallader, 1995) y el segundo en la determinación de grupos α -amino terminal (Benjakul y Morrisey, 1997).

4.5.1. Péptidos solubles en TCA 0.3 M

- a) Se adicionó una muestra de 0.5 mL de hidrolizado a 1 mL de TCA 0.3 M.
- b) Se conservó a temperatura ambiente por 20 minutos.
- c) Se filtró en papel Whatman del número 40.
- d) Se transfirió una alícuota de 0.25 μ l del filtrado a un tubo de 5ml, donde se le adicionaron 0.225 mL de agua destilada, 1.25 mL de NaOH 0.5 N y 0.25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu.
- e) La mezcla se agitó inmediatamente y se incubó a 30°C por 15 minutos,
- f) Se leyó la absorbancia de la muestra a 578 nm (Shimadzu®, UV-160), el valor obtenido se extrapoló en una curva estándar de tirosina (anexo 1).
- g) El grado de hidrólisis se definió como:

$$GH = (Dt - Do) / (Dmax - Do)$$

Dt, son los péptidos solubles en TCA 0.3 M al tiempo t, expresados como tirosina.

Do, corresponde a los péptidos solubles en TCA 0.3 M al tiempo 0.

Dmax son los péptidos solubles en TCA 0.3 M totales después de una hidrólisis ácida total del sustrato, realizada de la forma siguiente:

En una ampollita de vidrio se mezclaron 0.5 mL de sustrato inicial con 4.5 mL HCl 6N, la ampollita se selló al vacío y se mantuvo a 100 °C por 24 horas. La muestra hidrolizada se filtró a través de papel Whatman de número 40 para remover cenizas y el filtrado se neutralizó con NaOH 6N.

4.5.2. Grupos α -amino terminal

- a) En tubos ámbar de 2 mL con rosca, se colocaron 1 mL de buffer de fosfatos (pH 8.2), 63 μ l del hidrolizado y 0.5 mL de TNBS al 0.01%.
- b) La mezcla se agitó inmediatamente en un vórtex y se conservó en un baño de agua (Lauda[®]) a 50°C durante 30 minutos, en completa oscuridad.
- c) Para finalizar la reacción se adicionó 1 mL de sulfito de sodio 0.1 N.
- d) Se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 minutos y se midió la absorbancia a 420 nm, el valor obtenido se extrapolo en una curva estándar de L-leucina realizada el mismo día (anexo 1).
- e) El GH se determinó utilizando el método modificado de Baek y Cadwallader (1995), en el cual el GH se definió como:

$$GH = (D_t - D_o) / (D_{max} - D_o)$$

D_t son los grupos α -amino terminal al tiempo t , en términos de L-leucina.

D_o , corresponde a los grupos α -amino terminal al tiempo 0.

D_{max} , son los grupos α -amino terminal totales determinados después de una hidrólisis ácida total del sustrato inicial (ver sección 4.5.1).

4.6. Evaluación de Flavourzyme y Alcalasa

4.6.1. Cinética de hidrólisis

La hidrólisis enzimática para cada enzima se llevó a cabo a las condiciones de máxima actividad marcadas en la ficha técnica del proveedor. El procedimiento fue el siguiente:

- a) El SC se descongeló a 4°C durante toda la noche.

- b) En un reactor en agitación constante, se mezclaron 75 g de SC con 150 mL de buffer de fosfatos a pH 6 para Flavourzyme y de boratos a pH 9 para Alcalasa.
- c) La mezcla se homogeneizó y se incubó a la temperatura de reacción durante 30 minutos antes de la adición de la enzima. La concentración de enzima que se manejó es la máxima reportada en la ficha técnica (60 AU/kg de proteína para Alcalasa y 50 LAPU/g de proteína para Flavourzyme).
- d) La temperatura se mantuvo constante a 55°C para Alcalasa y 50°C para Flavourzyme, el pH se monitoreó durante toda la cinética y se ajustó con NaOH 6N y HCl 6N.
- e) A los tiempos 0, 5, 10, 30 y 60 minutos se tomaron por duplicado alícuotas de 0.25 mL y se colocaron en viales con 1 mL de SDS al 1%. Para finalizar la reacción enzimática, las muestras se mantuvieron a 85°C por 15 min.
- f) Las muestras se centrifugaron a 9 000 x g por 10 min.

Para cada tiempo de hidrólisis se realizó una caracterización del hidrolizado enzimático con base en: grado de hidrólisis, porcentaje de nitrógeno recuperado y perfil de pesos moleculares.

4.6.2. Grado de hidrólisis

El GH se determinó con base en los grupos α -amino terminal. Para una cuantificación adecuada con valores dentro del rango de la curva estándar de L-leucina, se realizó previamente la siguiente dilución: se tomó una alícuota de 10 μ l de la fracción soluble del hidrolizado y se llevó a 100 μ l con SDS, a partir de esta muestra se aplicó la metodología descrita en el punto 4.5. 2.

4.6.3. Nitrógeno recuperado

El porcentaje de nitrógeno recuperado se determinó en la forma siguiente:

- a) Para cada tiempo de hidrólisis se tomaron muestras de 1 mL y se mantuvieron a 85°C durante 15 minutos.
- b) Las muestras se centrifugaron a 9 000 x g por 10 minutos.
- c) El volumen del sobrenadante se registró y las muestras se deshidrataron hasta peso constante.
- d) Se determinó el nitrógeno en el sobrenadante por medio del equipo CHN.
- e) El porcentaje de nitrógeno recuperado se definió como:

$$\%NR = N \text{ en el sobrenadante del hidrolizado (mg) / N en la suspensión inicial (mg)}$$

4.6.4. Perfil electroforético de pesos moleculares

A partir de la determinación de nitrógeno recuperado para cada tiempo de hidrólisis, las muestras se diluyeron con SDS al 1% para obtener una concentración de 4 µg de proteína/µL. El proceso de electroforesis se realizó en geles de dodecil sulfato de sodio – poliacrilamida (SDS-PAGE) con una dimensión de 6x8 cm x 0.75 mm. Se utilizó una cámara de electroforesis Mini-Protean (BIO-RAD®). En cada carril del gel se inyectaron alícuotas de 5 µL de muestra correspondiente a cada tiempo de hidrólisis. Se aplicaron dos técnicas de electroforesis en condiciones desnaturizantes:

1. Método de Laemmli (1970). Se utilizó un gel de 12% de acrilamida-bisacrilamida y un estándar de proteínas de alto peso molecular (BIO-RAD®). La preparación de las soluciones y el procedimiento seguido se presenta en el anexo 2.
2. Modificación del método de Schagger y Jagow (1987). El método original reporta el uso de geles de 10x14 cm y un tiempo de corrida de 16 horas a 95 V, por lo tanto, se adaptó la técnica para el Mini-Protean. Se utilizó un gel de corrida de acrilamida-bisacrilamida del 16.5% con urea 6M y un estándar de proteínas de

bajo peso molecular (BIO-RAD®). La preparación de las soluciones y el procedimiento seguido se presenta en el anexo 2.

4.6.5. Filtración en Gel

Se utilizó un equipo FPLC (fast Performance Liquid Chromatography) de la marca BIO-RAD® Biologic LP® acoplado a una columna de vidrio (50 x 1.5 cm), de un volumen de aproximadamente 90 mL y empacada con la resina de exclusión *Sephadex G-50* (SIGMA®). El eluyente fue un buffer de fosfatos 2 mM con un pH 7.6. Una alícuota de 1ml de hidrolizado se filtró a través de una membrana de 0.45 µm (Phenomenex®) y se eluyó en la columna (flujo = 0.5 ml/min). Como estándar se utilizó una mezcla de vitamina B12 (1.5 kDa), lysosima (14.4 kDa) y ovoalbúmina (45 kDa).

4.7. Análisis de superficie de respuesta (ASR)

Se aplicó un ASR para analizar la influencia del pH, temperatura, relación sustrato:buffer (S:B) y concentración de enzima (E) sobre el grado de hidrólisis y obtener la región donde se maximiza la actividad proteolítica de Flavourzyme sobre los SC.

Para la selección del punto central del ASR, previamente se realizó un diseño factorial (Box y Behnken, 1960; Box y col., 1987), con tres variables independientes (T, pH S:B) y 3 niveles: T (40, 50, 60 °C), pH (4.5, 5.5, 6.5), S:B (1:1, 1:2, 1:3), manteniendo constante la concentración de enzima (E) en 50 LAPU/g. La variable respuesta fue el grado de hidrólisis (GH) a los 30 minutos.

Para el ASR se utilizó un diseño de composición central, ortogonal y rotatable de cuatro variables y bloqueado por cantidad de muestra (Vargas, 1989). El rango de cada variable independiente se definió con base a las especificaciones del proveedor

4.9.3. Liofilización

En matraces bola de 1 litro se colocaron 250 mL de las fracciones peptídicas y se congelaron con nitrógeno líquido. El proceso de liofilización se llevó a cabo durante 12 horas en un equipo Labconco® 4.5.

4.9.4. Análisis de funcionalidad

4.9.4.1. Solubilidad

La solubilidad de las fracciones peptídicas se determinó con base en el método de Quaglia y Orban, 1987b:

- a) Se dispersó 0.1 g de la fracción peptídica en 5 mL de una solución 1 M de NaCl.
- b) El pH se ajustó a 7 con la adición de HCl 0.1 M y NaOH 0.1M.
- c) La solución se mantuvo en constante agitación por 20 minutos.
- d) Se centrifugó a 9 000 x g por 10 minutos a 4°C.
- e) Se determinó nitrógeno en el sobrenadante y en la muestra original.
- f) El porcentaje de solubilidad se calculó con la siguiente fórmula:

$\% \text{Solubilidad} = \frac{\text{Nitrógeno en el sobrenadante}}{\text{Nitrógeno en la muestra original}} \times 100.$

4.9.4.2. Capacidad de emulsión

La capacidad de emulsión se determinó por conductividad eléctrica, el cual es un método basado en la resistencia eléctrica de una emulsión (Swift y col., 1961):

- a) Para cada fracción peptídica se preparó una solución de 5 mg de fracción peptídica/ mL de NaCl 1 M.
- b) Se fabricó un tubo de silicón de 3.2 cm de diámetro por 10 cm de alto. A medio centímetro del fondo se insertaron dos alambres de cobre No. 14 como electrodos. En dicho tubo se colocaron 5 mL de aceite de maíz y 5 mL de la solución de fracción peptídica.
- c) Se homogeneizó la mezcla por 5 segundos con un equipo Ultra-turrax (Janke & Kunkel) a una velocidad de 10 000 rpm. Inmediatamente después se adicionó aceite con una bureta a una velocidad de 1 mL/6-7 segundos, registrando la resistencia eléctrica con un multímetro digital, hasta que ésta se vió interrumpida.
- d) Se determinaron los mililitros de aceite adicionados y se reportaron por 100 mg de fracción peptídica.

4.9.4.3. Índice de actividad emulsificante

El índice de actividad emulsificante se midió por el método de Pearce y Kinsella (1978), modificado por Dagorn-Scaviner y col. (1987):

1. Se preparó una solución de cada fracción peptídica al 1% en buffer de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0. Se pesaron los gramos de fracción peptídica correspondientes a 100 mL de buffer y sólo se agregaron 70 mL de buffer, ya que posteriormente se aforaría a 100 ml.
2. Se homogeneizó a 8 000 rpm en un equipo Ultra-turrax durante 1 minuto.
3. Se midió el pH y se ajustó a pH=7.0.
4. Se vació el homogeneizado y se aforó con el buffer de fosfatos a 100 ml.
5. Se colocaron 50 mL de una solución SDS 0.1%-NaCl 0.1M, pH=7.0 en matraces Erlenmeyer de 125 ml. Se tomaron 200 µl de ésta solución y se desecharon.
6. Se homogeneizó a 20 000 rpm durante 30 segundos en el Ultra-turrax.
7. Se tomaron 200 µl del homogeneizado y se agregaron al matraz con la solución SDS-NaCl.

8. Las muestras se leyeron a 500 nm por triplicado.

El índice de actividad emulsificante (IAE) se determinó de la siguiente forma:

$$\text{IAE} = 2\text{TD}/\phi\text{C}$$

En donde:

T=Turbidez = $2.303 \times (\text{densidad óptica})/0.01$

ϕ =Fracción volumétrica de la fase dispersa (aceite). En este caso $\phi=0.25$.

D= Dilución.

C=Concentración de proteína.

4.9.4.4 Índice de estabilidad de emulsión

Se determinó por el método de resistencia a la coalescencia de Dargorn-Scaviner (1987):

1. Se preparó una solución de cada fracción peptídica al 1 % en buffer de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0. Se siguió el mismo procedimiento que en el punto 4.9.4.3..
2. Se homogeneizó a 8 000 rpm en un equipo Ultra-turrax durante 1 minuto.
3. Se midió el pH y se ajustó a pH=7.0.
4. Se vació el homogeneizado y se aforó con el buffer de fosfatos a 100 ml.
5. Se colocaron 75 mL de la solución en un matraz Erlenmeyer de 200 mL y se agregaron 25 mL de aceite de maíz (medido con bureta) a velocidad constante.
6. Se homogeneizó a 20 000 rpm durante 2 minutos en el Ultra-turrax.
7. Inmediatamente se vació la emulsión en 4 tubos de centrifuga y se balancearon.
8. Se centrifugaron a 2 000 x g durante 10 minutos. Al término de este tiempo se midió lo siguiente de los tubos:

V_i = volumen inicial de aceite en la emulsión (aprox .2.5 ml)

Volumen de fase apolar dispersa= vol. parcial/vol. total= $25/(75+25)=0.25$

227613

$\% \text{ de aceite coalescido} = \text{vol. de aceite coalescido} \times 100 / (\text{vol. total tubo} \times 0.25)$.

La estabilidad de emulsión se determinó con la siguiente fórmula:

Estabilidad de emulsión = 100 - % de aceite coalescido

4.9.5. Perfil de aminoácidos

La composición de aminoácidos de las fracciones peptídicas se determinó después de la hidrólisis de 0.5 mg de muestra con 2 mL de una solución de HCl 6N, 0.05% de 2-mercaptoetanol y 0.02% de fenol, a 115°C por 24 horas (Benjakul y Morrissey, 1997). Para determinar el triptofano en las muestras, se realizó una hidrólisis de 0.2 mg de muestra en 1 mL de ácido metanosulfónico 4M por 24 horas a 110°C (Penke y col., 1974). Se utilizó un sistema analizador de aminoácidos Beckman 6300 (Beckman Instruments, Inc.).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización de los subproductos de Carpa (SC)

Un importante criterio para seleccionar los SC como sustrato fue su contenido de grasa menor al 5% (Sikorski, 1994). Debido a que además de reducir la aparición de olores desagradables por la oxidación de grasas, se evita realizar alguna operación unitaria para remover o estabilizar con antioxidantes la grasa del hidrolizado.

Los SC utilizados en este trabajo son producto del fileteado de carpa y están constituidos principalmente de músculo, esqueleto y piel. Por lo tanto, su composición de humedad, y proteína difieren de los valores reportados en la literatura para el músculo de carpa (tabla 5.1). Además del contenido de proteína, la composición de aminoácidos esenciales es diferente ya que el colágeno es la principal proteína presente en el SC (Sikorski, 1994).

Tabla 5.1. Composición porcentual del SC y del músculo de carpa

	SC	Músculo de Carpa ¹
Humedad	82.50 ± 0.35	72.50
Proteína	14.25 ± 0.42	18.90
NNP ²	0.15 ± 0.005	No reportado

¹ Sikorski, 1994

² Nitrógeno no proteico

5.2. Estandarización de técnicas para la determinación de grado de hidrólisis

Por las condiciones de pH neutro en las que se realiza la hidrólisis con Flavourzyme (Novo) se evaluaron dos métodos para la cuantificación de grado de hidrólisis (GH), en los cuales no influye el pH del hidrolizado en la cuantificación de

GH. El primero con base en los péptidos solubles en TCA 0.3 M y el segundo a partir de los grupos α -amino terminal determinados por TNBS.

Los criterios de validación de las metodologías se basaron tanto en el análisis de los valores experimentales como en las posibles interferencias reportadas para cada método (Lowry y col, 1951; Adler-Nissen, 1979). Además, para controlar el efecto de otras variables se utilizó como sustrato caseína grado reactivo.

En la figura 5.1 se presenta la hidrólisis de caseína con Alcalasa durante 2 horas, determinando el GH por los dos métodos antes mencionados. La forma de la curva de la cinética obtenida por ambas técnicas es característica de este tipo de procesos enzimáticos. En los primeros 30 minutos se observó una rápida tasa de reacción y luego de este tiempo la velocidad de reacción decreció. Curvas similares se han reportado en hidrólisis enzimáticas de subproductos pesqueros (Quaglia y Orban, 1987; Baek y Cadwallader, 1995; Shahidi y col., 1995; Diniz y Martín, 1996; Benjakul y Morrissey, 1997).

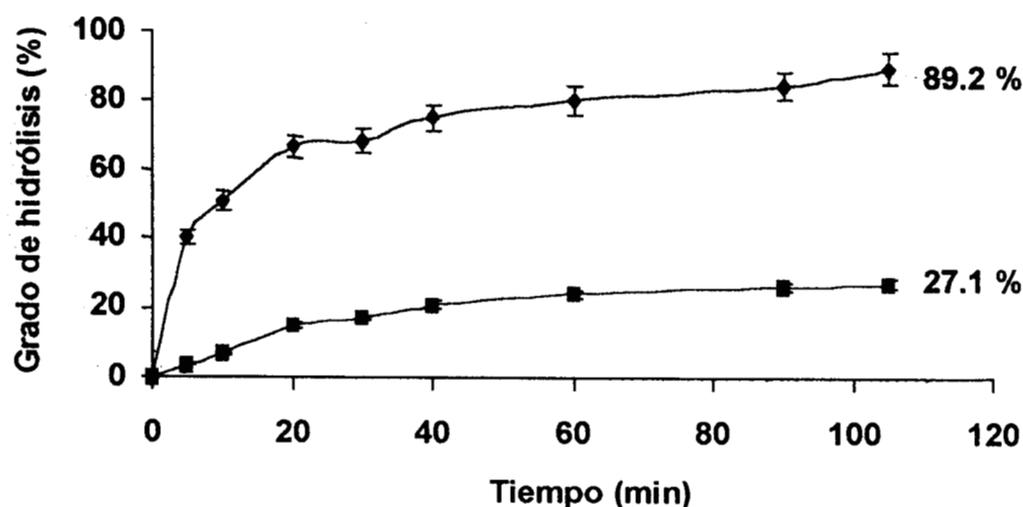


Figura 5.1. Cinética de hidrólisis de caseína con Alcalasa 55°C, pH 9, 40% S:B y 60 AU/Kg. ♦ Péptidos solubles en TCA 0.3 M. ■ Grupos α -amino terminal

Archer y col. (1973) propusieron que la tasa de rompimiento de enlaces peptídicos en los concentrados de proteína, controla la velocidad del proceso de hidrólisis. Adler-Nissen (1986) menciona que este comportamiento resulta de un tipo de inhibición por producto, donde el sustrato original compite por la enzima con los péptidos resultantes de la hidrólisis.

En la figura 5.1. se puede observar que el GH final determinado por el método de grupos α -amino terminal (GH=27%) es cercano al reportado por el proveedor de Alcalasa (GH=20%), el cual fue cuantificado por el mismo método (Novo).

En contraste, el valor de GH calculado como péptidos solubles en TCA 0.3 M fue muy superior (GH=89%) del valor referido por el proveedor (GH=20%). Lo cual pudo ser ocasionado por una cuantificación del contenido total de péptidos solubles en TCA 0.3 M por debajo de lo real, lo que provoca un valor de GH elevado (ver capítulo 4.5.1). Lo anterior puede ser resultado de la alteración de la estructura química de ciertos aminoácidos como tirosina y triptofano durante la hidrólisis ácida (necesaria para la determinación de péptidos solubles totales en TCA 0.3 M), con los cuales reacciona el reactivo de fosfomolibdeno-wolframato del método de Lowry para la determinación de proteína utilizado para este método. Además, en la cuantificación de proteína por Lowry puede interferir el SDS, los lípidos y en menor proporción los carbohidratos del SC (Badui, 1994).

Por otra parte, una ventaja de la determinación del GH por medio de los grupos terminales, es la posibilidad de cuantificar teóricamente la concentración (mM) de los grupos α -amino total a partir del tipo y contenido de proteína del sustrato (Spendler, 1990): $(\text{mg/l proteína} / 6.25) / (14 \text{ mg N/meqv}) = [\text{mM}]$

Para la cinética anterior la concentración total en el sustrato de grupos α -amino correspondió a 115 mM y el valor experimental fue de 100 mM, lo cual puede ser un indicador de la reproducibilidad del método.

Cabe mencionar que durante la reacción de los grupos α -amino terminal con el reactivo TNBS, fue muy importante el control de la temperatura y las condiciones de obscuridad ya que el reactivo TNBS es termo y fotosensible. Por lo cual fue necesario utilizar tubos ámbar con rosca sumergidos en un baño a temperatura controlada.

Por la reproducibilidad de los resultados de GH y su cercanía con los reportados por el proveedor de Alcalasa, se decidió utilizar el método de grupos α -amino terminal para la determinación de GH de las proteasas estudiadas en este trabajo.

5.3. Evaluación de Alcalasa y Flavourzyme

Una de las proteasas comerciales más estudiada en hidrolizados de pescado ha sido la Alcalasa® con acción de endopeptidasa, el rango de pH donde presenta mayor actividad es de 8 a 9.5 (Novo). Con esta enzima se ha obtenido la mayor extracción de proteína, sin embargo, se requiere de la adición constante de NaOH 6N para mantener el pH alcalino. Lo cual puede ser indeseable en un proceso industrial ya que aumenta el costo y eleva el contenido de cenizas en el producto final (Quaglia y Orban, 1986).

Por otra parte, en la literatura ha sido poco reportado el uso de Flavourzyme®, el cual es un complejo de enzimas proteolíticas con acción endo y exopeptidasas dependiendo del pH del medio (5 – 7), por dichas características resulta de especial interés su estudio.

Para evaluar la actividad proteolítica de la Alcalasa y Flavourzyme sobre los SC, se llevó a cabo una hidrólisis enzimática a las condiciones de máxima actividad de cada enzima proporcionadas por el proveedor (Novo). Se evaluó el grado de

hidrólisis, el nitrógeno recuperado y el perfil de pesos moleculares de las fracciones peptídicas obtenidas con ambas enzimas.

5.3.1. Grado de hidrólisis

El GH obtenido con Alcalasa después de 60 minutos de hidrólisis fue de 29.3%, mientras que, con Flavourzyme se obtuvo un GH de 25.8 % (figura 5.2). En ambas cinéticas no se consideró la acción de las enzimas endógenas del SC, las cuales se discutirán más adelante.

En la hidrólisis con Alcalasa se requirió de la adición constante de NaOH 6N para mantener el pH en 9. En contraste, en la hidrólisis con Flavourzyme a pH 6 no se requirió de este ajuste. Lo anterior ocurre porque los pK del grupo carboxilo y del grupo amino resultantes de la hidrólisis (3.1 a 3.6 y 7.5 a 7.8, respectivamente), provocan que durante el proceso de reacción proteolítica a pH 6, la captura y liberación de protones esté en equilibrio, lo que aumenta la capacidad amortiguadora del sistema.

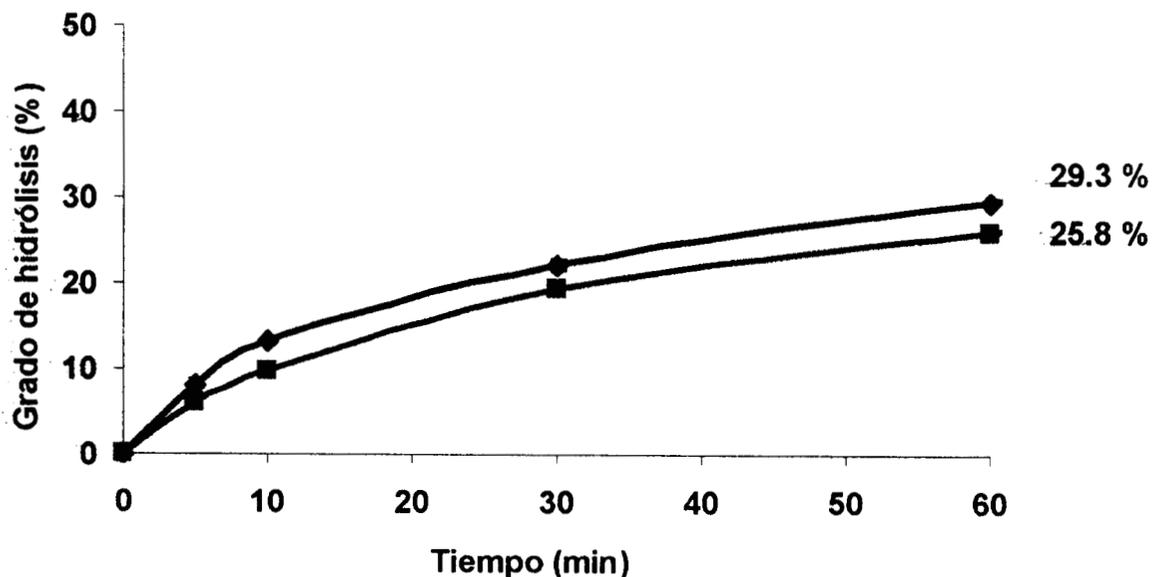


Figura 5.2. Cinética de hidrólisis de SC:

(A) ♦ Alcalasa a 55°C, pH 9, 40% S:B y 60 AU/Kg.

(B) ■ Flavourzyme a 52°C, pH 6, 40% S:B y 50 LAPU/g.

En la tabla 5.2 se presentan los valores de GH reportados en diferentes estudios de hidrólisis con Alcalasa sobre diferentes sustratos de organismos acuáticos, determinados por grupos α -amino terminal, péptidos solubles en TCA 0.3 M y pH-Stat.

La diversidad de valores que se observa responde a que el grado de hidrólisis en este tipo de reacciones enzimáticas depende de las características del sustrato, de las condiciones de hidrólisis (pH y T), de la concentración de enzima y su especificidad para con el sustrato, así como del tiempo de reacción, entre otros factores (Adler-Nissen, 1986).

Tabla 5.2. GH reportado con Alcalasa determinado por diversos métodos

Sustrato	Tiempo Min.	GH (%)	Condiciones	Autores
<u>Grupos α-amino terminal</u>				
Músculo de Foca	190	23	pH 8.5, 60°C	Shahidi y Synowiecki, 1994
Subproductos de Blanco del Pacífico.	30	63	pH 9.5, 60°C	Benjakul y Morrisey, 1997
<u>Péptidos solubles en TCA</u>				
Músculo de Arenque.	60	45	pH 8, 50°C	Hoyle y Merrit, 1994
Subproducto de Cangrejo	90	55	pH 9, 70°C	Beak y Cadawallader, 1995
<u>pH- Stat</u>				
Músculo de Dogfish	120	19	pH 8.3, 53°C	Diniz y Martin, 1996
Músculo de Sardina	120	23	Nr	Quaglia y Orban, 1987
Nr. No reportado				

5.3.2. Nitrógeno recuperado

La importancia de la cuantificación del NR radica en que refleja la cantidad de proteína que puede ser recuperada en el proceso de hidrólisis, mientras que el GH es usado como indicador de la ruptura de enlaces peptídicos (Adler-Nissen, 1993).

En la figura 5.3, se observa que el NR después de 60 minutos de hidrólisis con Alcalasa fue de 77.5%, en cambio, de la hidrólisis con Flavourzyme se obtuvo un NR de 51.8%. Además, después de 5 minutos de hidrólisis con Alcalasa se logra un NR parecido al que se logra al minuto 30 con Flavourzyme. En otros estudios con Alcalasa sobre sustratos de productos marinos, el NR reportado ha sido de 92% (Shahidi y col., 1994) y 70% (Benjakul y Morrissey, 1997) después de 30 minutos de hidrólisis.

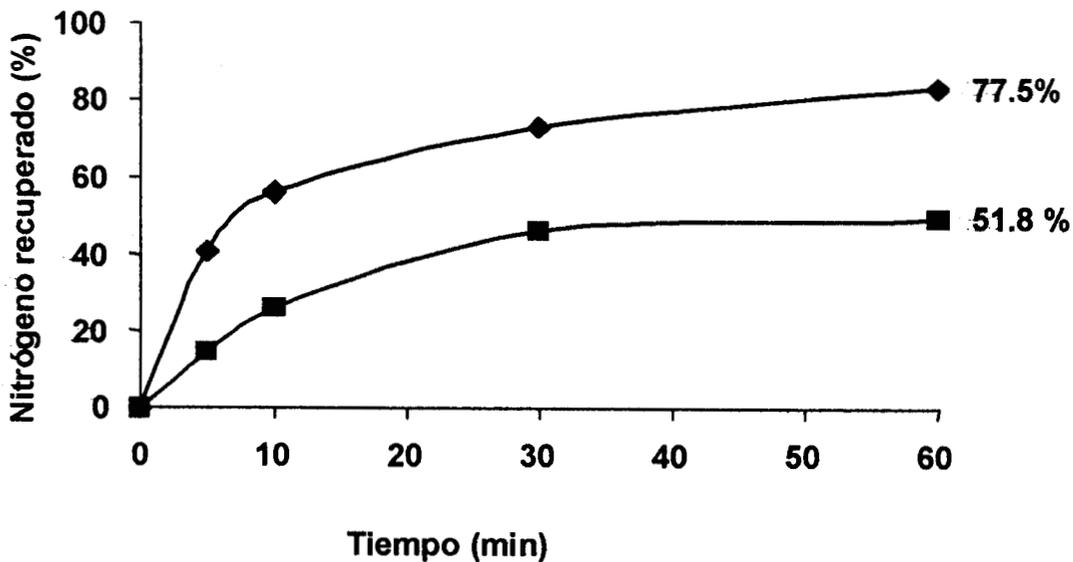


Figura 5.3. Nitrógeno recuperado en una cinética de hidrólisis de SC con:
 (A) ♦ Alcalasa a 55°C, pH 9, 40% S:B y 60 AU/Kg.
 (B) ■ Flavourzyme a 52°C, pH 6, 40% S:B y 50 LAPU/g.

Por otra parte, en la figura 5.4 se observa que NR es directamente proporcional al GH. Los coeficientes de determinación ($R^2 = 0.9624$ y $R^2 = 0.9959$ obtenidos por Alcalasa y Flavourzyme, respectivamente) muestran una cercana relación entre el NR y el GH, siendo ésta marcadamente lineal para la hidrólisis de Flavourzyme sobre los SC.

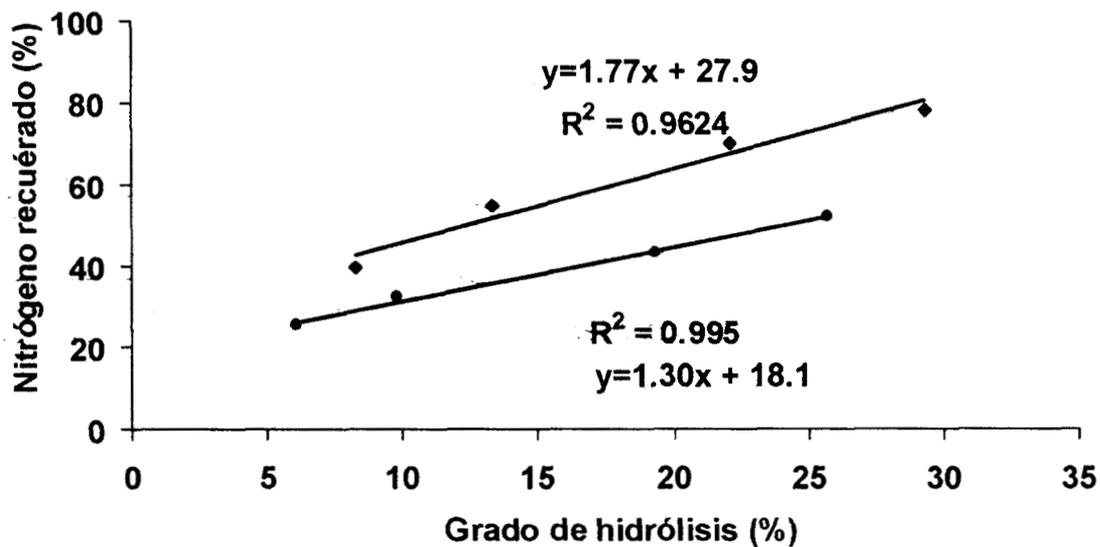


Figura 5.4. Relación entre GH y NR durante 60 minutos de SC con:
 (A) ♦ Alcalasa a 55°C, pH 9, 40% S:B y 60 AU/Kg.
 (B) • Flavourzyme a 52°C, pH 6, 40% S:B y 50 LAPU/g.

La diferencia entre los coeficientes de determinación para ambas enzimas puede ser resultado de su actividad y afinidad por el DS.

5.3.3. Perfil electroforético de pesos moleculares

El perfil de pesos moleculares (PPM) de las fracciones peptídicas después de las cinéticas de hidrólisis con Flavourzyme y Alcalasa se presenta en la figura 5.5.

El PPM del SC sin hidrolizar (C) presenta bandas que corresponden a miosina, actina, tropomiosina, troponinas, etc., de éstas la actina con un peso molecular de 41.7 kDa es la que predomina en el SC. Por otra parte, la región de bandas poco definidas de alrededor de 97.4 kDa puede ser resultado de la degradación de la cadena pesada de miosina (475 kDa) debido a la autólisis durante la generación y el manejo del desecho. Benjakul y Morrissey (1997) reportan que el 45% de la miosina de cadena pesada en el músculo de Blanco del Pacífico se degradó después de 8 días de almacenamiento en hielo, sin embargo, no se encontró una degradación significativa en la actina.

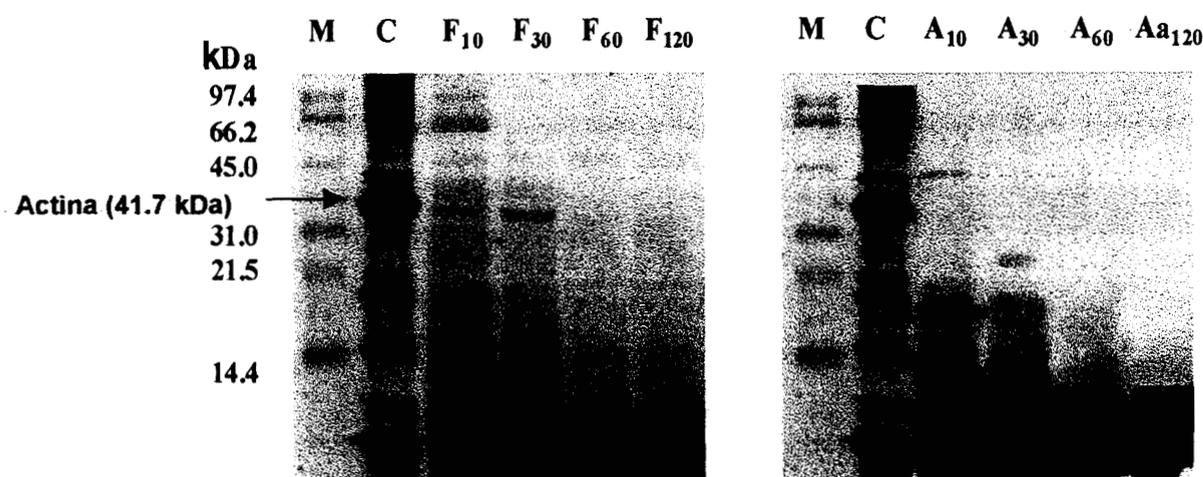


Figura 5.5. Patrones electroforéticos de las fracciones peptídicas durante la cinética de hidrólisis con Flavourzyme (F) y Alcalasa (A), método tradicional de SDS-PAGE. La numeración corresponde al tiempo de reacción en minutos, (C) muestra sin hidrolizar y (M) marcador.

Después del tratamiento con Flavourzyme y Alcalasa, las bandas con altos pesos moleculares disminuyeron paulatinamente con el tiempo de hidrólisis y desaparecieron casi por completo después de 60 minutos. La mayor densidad de bandas se concentró debajo de 14.4 kDa, sin embargo, esta región no se pudo definir adecuadamente debido a que péptidos menores de 10 kDa no pueden

separarse por el procedimiento estándar de SDS-PAGE. Lo anterior se debe a que las moléculas del complejo SDS-péptido que se forman tienen dimensión y carga similar, lo que provoca que emigren juntas durante la corrida.

Este problema se resolvió al disminuir el tamaño de las micelas formadas por el SDS gracias a la adición de urea 6M y utilizando tricina en vez de glicina en el buffer de corrida (Schägger y Jagow, 1987). Con esta modificación se logró una mejor separación de bandas de las fracciones peptídicas de mediano y bajo peso molecular que la obtenida con el procedimiento clásico de SDS-PAGE.

En la figura 5.6 se presenta el perfil electroforético de la hidrólisis de SC con Alcalasa, se observa que al minuto 60 los péptidos resultantes tienen un peso molecular por debajo de 17 kDa y la mayor parte de éstos inferior a 5 kDa. Lo cual aumenta la probabilidad de aminoácidos libres y péptidos de cadena corta menores de 1kDa y con ello sus propiedades nutricionales y funcionales se restringen (Cui y Piggot, 1995; Hall, 1992; Cowey, 1988; Webb, 1990; Hardy, 1992).

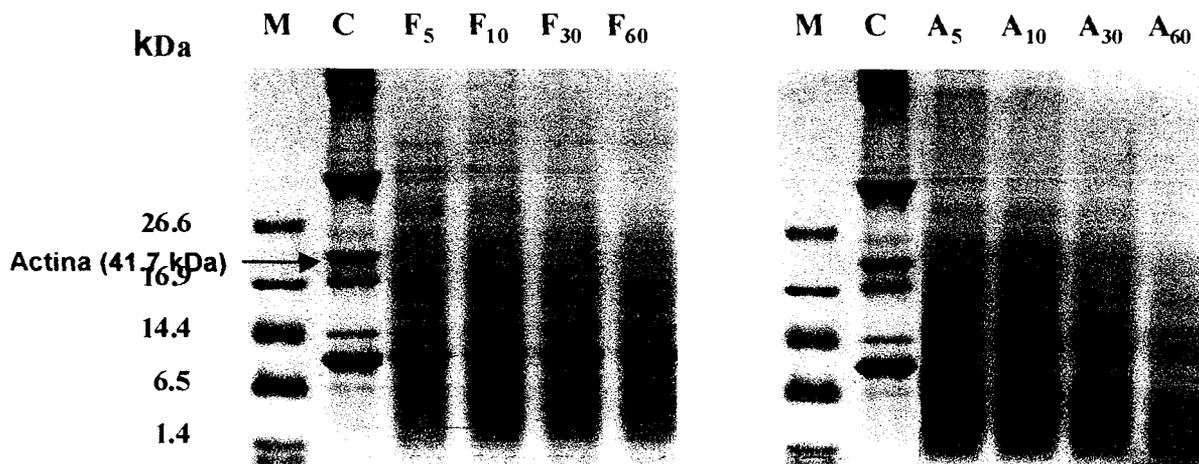


Figura 5.6. Patrones electroforéticos de las fracciones peptídicas durante la cinética de hidrólisis con Flavourzyme (f) y Alcalasa (A), método modificado para péptidos de bajo peso molecular. La numeración corresponde al tiempo de reacción en minutos, (C) muestra sin hidrolizar y (M) marcador.

En cambio, la hidrólisis con Flavourzyme a los 60 minutos resulta en fracciones peptídicas con un mayor rango de pesos moleculares, la mayoría de ellas menores de 26.6 kDa. Por lo que, con una adecuada separación por ultrafiltración se pueden obtener fracciones peptídicas con diferente funcionalidad (Vega y Brennan, 1987; Quaglia y Paoletti, 1989).

Resumiendo, la Alcalasa con actividad de endopeptidasa llevó a cabo una hidrólisis más extensiva que Flavourzyme con actividad endo y exopeptidasa. La hidrólisis con Alcalasa produjo mayor cantidad de péptidos solubles en menos tiempo que con Flavourzyme, sin embargo, se generó una mayor cantidad de péptidos de peso molecular menor a 5 kDa, lo que disminuye las propiedades nutricionales y funcionales del hidrolizado. Además, durante la hidrólisis con Alcalasa se requirió de un ajuste constante de pH con NaOH, lo cual puede ser indeseable a nivel industrial ya que es necesario la separación del álcali en el producto final.

Para continuar el estudio de la actividad proteolítica de Flavourzyme sobre los SC, se realizó un análisis de superficie de respuesta con el objetivo de optimizar las condiciones de hidrólisis de Flavourzyme. Además, se analizó la influencia del pH, temperatura, relación sustrato:buffer (S:B) y concentración de enzima (E) sobre el grado de hidrólisis y se obtuvo la región donde se maximiza la actividad proteolítica de Flavourzyme sobre los SC.

5.4. Análisis estadístico de superficie de respuesta de Flavourzyme

Como en la sección 5.3.2 se verificó la relación lineal que existe entre GH y NR, fue posible elegir el GH como variable de respuesta para el ASR y extrapolar su modelo matemático al NR.

Tabla 5.3. Valores de la variable respuesta del diseño experimental

Bloque 1						Bloque 2						Bloque 3					
E ^a	V.I. ^b				V.R. ^c	E ^a	V.I. ^b				V.R. ^c	E ^a	V.I. ^b				V.R. ^c
#	T	pH	S:B	E	GH	#	T	pH	S:B	E	GH	#	T	pH	S:B	E	GH
1	+1	+1	-1	+1	15.22	12	+1	+1	-1	-1	11.03	23	-2	0	0	0	18.29
2	+1	-1	-1	-1	16.36	13	+1	-1	+1	-1	16.05	24	+2	0	0	0	9.65
3	-1	+1	-1	-1	15.64	14	-1	+1	-1	+1	21.73	25	0	-2	0	0	16.98
4	+1	+1	+1	-1	9.05	15	-1	-1	-1	-1	18.75	26	0	+2	0	0	11.31
5	-1	-1	+1	-1	15.26	16	-1	-1	+1	+1	21.06	27	0	0	-2	0	16.24
6	+1	-1	+1	+1	18.70	17	+1	-1	-1	+1	23.16	28	0	0	+2	0	16.53
7	-1	+1	+1	+1	17.71	18	-1	+1	+1	-1	15.03	29	0	0	0	-2	12.66
8	-1	-1	-1	+1	25.02	19	+1	+1	+1	+1	11.76	30	0	0	0	+2	23.75
9	0	0	0	0	20.30	20	0	0	0	0	20.63	31	0	0	0	0	18.93
10	0	0	0	0	20.30	21	0	0	0	0	19.92	32	0	0	0	0	19.53
11	0	0	0	0	18.13	22	0	0	0	0	20.04	33	0	0	0	0	20.08

^aExperimento (Las combinaciones de tratamientos se asignaron al azar en los ensayos).

^bVariables independientes.

^cVariable respuesta.

El diseño experimental, así como los valores de GH a los 30 minutos de hidrólisis enzimática con Flavourzyme se presentan en la tabla 5.3. A partir de los valores de GH en los puntos centrales de cada bloque, se obtuvo un error estándar de 0.81 el cual representó el error experimental durante el análisis.

5.4.1. Prueba de normalidad

Para realizar el análisis de regresión fue necesario verificar que los valores de la variable de respuesta GH se distribuyeran normalmente. En la figura 5.7, se presenta el histograma de la distribución de frecuencias de GH, se observa una distribución normal con una media en GH=17.5% y una desviación estándar de 3.9.

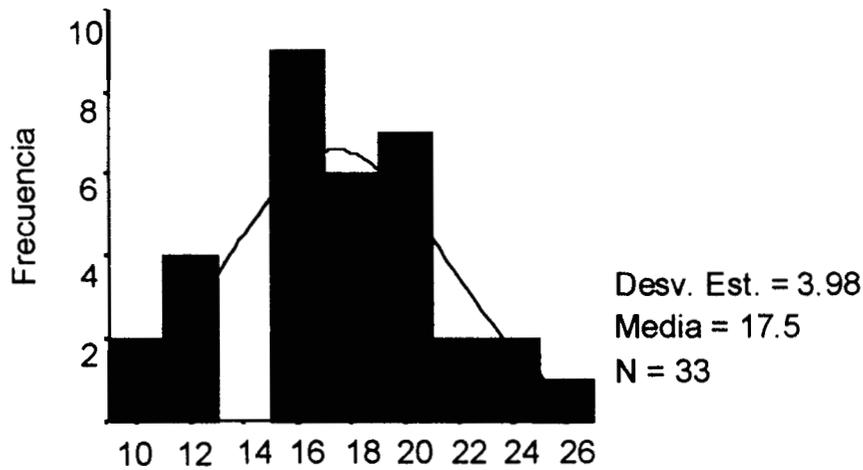


Figura 5.7 | Grado de Hidrólisis al ASR.

5.4.2. Prueba de varianza y ajuste del modelo

En la tabla 5.4, se presenta el análisis de regresión para el ajuste de los datos a un modelo matemático de segundo orden. Se observa que las variables pH, T y E en su forma lineal, junto con pH y T cuadráticas son las que más significativamente influyen en el GH.

Tabla 5.4. Análisis de regresión

Factor	Coefficiente	Nivel de Significancia
Constante	-321.242	.000
pH	46.033	.000
T	7.131	.000
E	0.267	.000
S:B	0.291	.013
pH ²	-2.409	.000
T ²	-0.049	.000
S:B ²	-0.00276	.012
pHxT	-0.325	.001
ExS:B	-0.00262	.074

A continuación se presenta la ecuación ajustada para los coeficientes significativos ($p < 0.075$) del análisis de regresión:

$$GH = -321.2 + 46pH - 2.4pH^2 + 7.13T - 0.494T^2 - 0.32pH \times T + 0.29S:B - 0.0027S:B^2 + 0.26E - 0.0026E \times S:B$$

El modelo matemático revela un valor máximo ($GH = 26.8\%$) en las condiciones: $pH = 5.9$, $T = 53^\circ C$, $S:B = 25$ y $E = 80$ LAPU/g. El valor $R^2 = 0.928$ del modelo nos indica que sólo el 7.2 % del total de la variación no lo explica y el 92.8% de las veces podrá predecir el grado de hidrólisis. Por su parte, el efecto de bloques está considerado en el diseño experimental (capítulo 2.2.3.1).

Cabe mencionar que el análisis estadístico anterior es válido únicamente dentro de los rangos estudiados de las variables independientes.

5.4.3. Gráficas de contorno

Las gráficas de contorno se realizaron a partir del modelo de predicción de GH, con el fin de tener una mejor apreciación de la influencia de cada par de variables independientes (pH, T, S:B, E) sobre el GH.

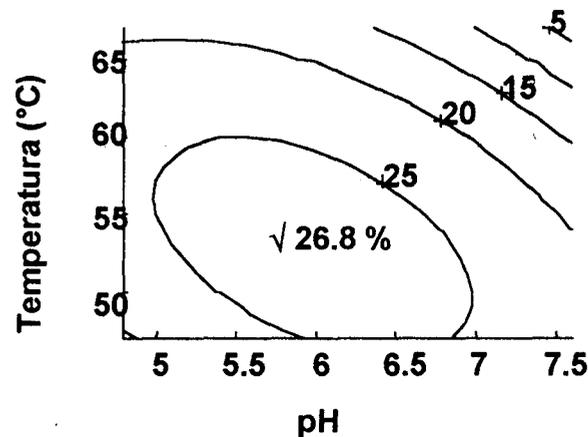


Figura 5.8 Gráfica de contorno de GH de SC con Flavourzyme en función de pH y T, S:B=25% y E=80 LAPU/g.

En primer término, se observó la reducción del GH a medida que el pH y la temperatura se alejaban de la región de máxima respuesta (figura 5.8); lo cual se explica por la paulatina disminución de la actividad proteolítica de la enzima, hasta su desnaturalización en los valores más altos de pH y temperatura.

Una dependencia similar, entre la actividad enzimática, el pH y la temperatura se ha observado en procesos de hidrólisis de proteínas alimenticias utilizando proteasas de origen animal (Surowka y Fik, 1994), así como de origen microbiano (Surowka y fik, 1992; Ferreira y Hultin, 1994; Baek y Cadwallader, 1995; Diniz y Martín, 1996; Benjakul y Morrissey, 1997).

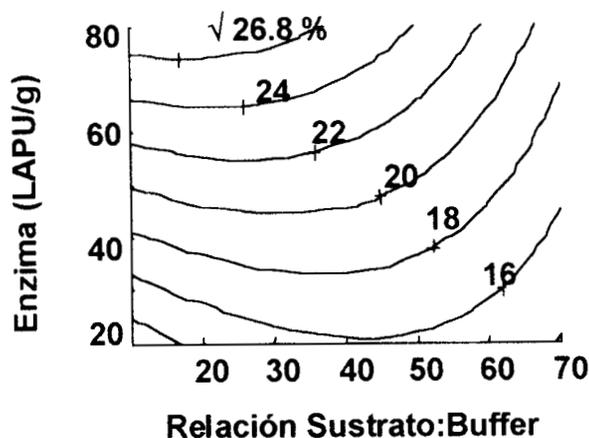


Figura 5.9 Gráfica de contorno de GH de SC con Flavourzyme en función de E y S:B, T=53°C y pH=5.9.

Por otra parte, mientras se incrementó la concentración de enzima el GH aumentó (figura 5.9). En un estudio de Cheftel y col. (1971) sobre concentrados de proteína de pescado, se concluye que un incremento en la concentración de enzima tiene un efecto positivo sobre el proceso de hidrólisis con el subsecuente incremento de la solubilización de proteína. Shahidi y col. (1995), reportaron que no se observa un incremento considerable en el GH cuando la enzima se adiciona durante la fase estacionaria de hidrólisis.

Un comportamiento parecido se ha reportado en la hidrólisis de subproductos pesqueros hidrolizados con Alcalasa, donde la relación entre la concentración de enzima y el GH es logarítmica (Beak y Cadwallader, 1995; Diniz y Martín, 1996; Benjakul y Morrissey, 1997). Cabe mencionar, que lo mismo se ha reportado en la hidrólisis con Alcalasa de diversos sustratos: carne de res (O'Meara y Munro, 1984) y proteína de soya (Constantinides y Adu-Amankwa, 1980); donde a elevadas concentraciones enzimáticas se ha presentado algún tipo de inhibición e hidrólisis de la propia enzima.

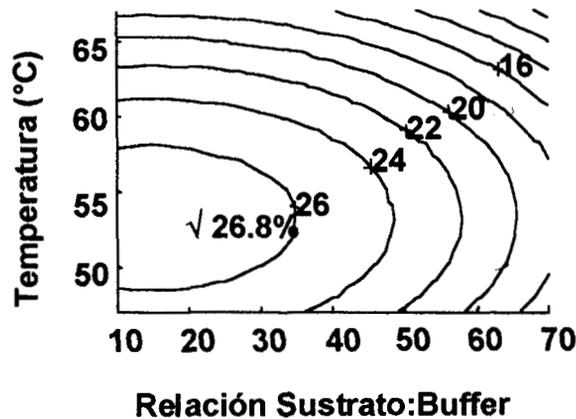


Figura 5.10 Gráfica de contorno de GH de SC con Flavourzyme en función de T y S:B, E=80 LAPU/g y pH 5.9.

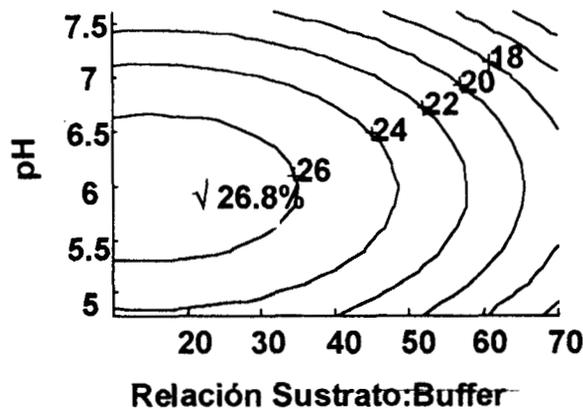


Figura 5.11 Gráfica de contorno de GH de SC con Flavourzyme en función de pH y S:B, E=80 LAPU/g T=53°C.

Así también, al aumentar la relación sustrato/buffer (figuras 5.9, 5.10 y 5.11) el GH disminuyó. Como resultado de agregar más sustrato a la mezcla de reacción, aumentó la viscosidad de la mezcla y se redujo la superficie de contacto entre la enzima y el sustrato (Surówka y Fik, 1992, 1994; Benjakul y Morrisey, 1997); además, se pudo incrementar la cantidad de minerales presentes lo cual merma la actividad enzimática (Beak y Cadwallader, 1995).

5.4.4. Validación del análisis de superficie de respuesta

Para comprobar la validez del modelo de predicción, se realizaron tres cinéticas de hidrólisis a las condiciones de pH y temperatura de máxima respuesta y variando únicamente S:B y E. En la figura 5.12 se presenta la gráfica de contorno que predice GH en función de S:B y E después de 30 minutos de hidrólisis enzimática con Flavourzyme, y con un asterisco se marcan el valor teórico predicho por el modelo correspondientes a las condiciones de E y S:B que se presentan en la tabla 5.5.

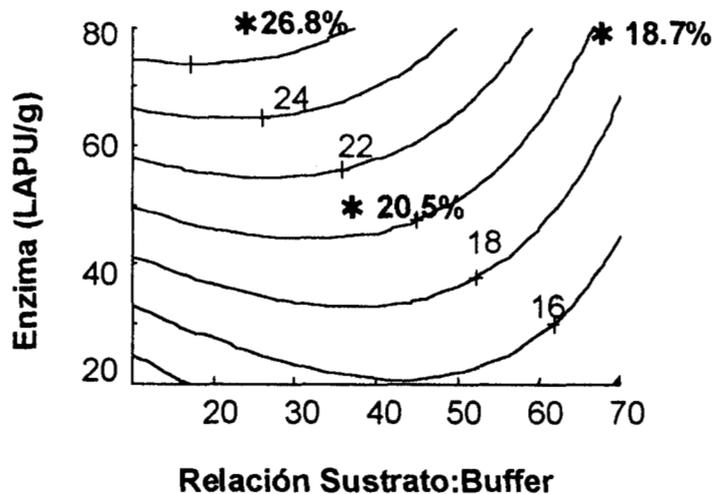


Figura 5.12 GH de SC con Flavourzyme en función S y E, pH 5.9, 53°C, t=30 min.

Tabla 5.5 GH teórico y experimental en función de S:B y E, pH=5.9, T=53°C

Condiciones de S:B y E	GH predicho por el modelo (%)	GH experimental (%)
25%, 80 LAPU/g	26.8	24.8
70%, 80 LAPU/g	18.7	20.7
40%, 50 LAPU/g	20.5	18.8

Se puede observar que el valor experimental es muy cercano al predicho, sin embargo, la diferencia entre ellos es mayor que la desviación estándar del modelo de predicción (0.81), lo que significa que existe una fuente de variación extra no contenida en el modelo y que influye en los resultados.

En las figuras 5.13 y 5.14, se presentan las cinéticas de hidrólisis de GH y NR en las condiciones de S:B y E antes mencionados. Además, se cuantificó la hidrólisis que se lleva a cabo sin adición de enzima y que se realiza por las enzimas endógenas del SC, tales como catepsinas y enzimas lisosomales (Penny, 1980).

Se puede apreciar, que la aportación de las enzimas endógenas del SC al GH después de 120 minutos de hidrólisis fue sólo del 1.2%, lo cual se explica por la frescura del SC y que no contenía vísceras. En estas condiciones se recuperó hasta un 18% de nitrógeno (figura 5.14), lo cual corresponde a las proteínas miofibrilares solubles en soluciones de baja fuerza iónica, a las fracciones peptídicas producto de la autólisis, a los péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres propios del SC

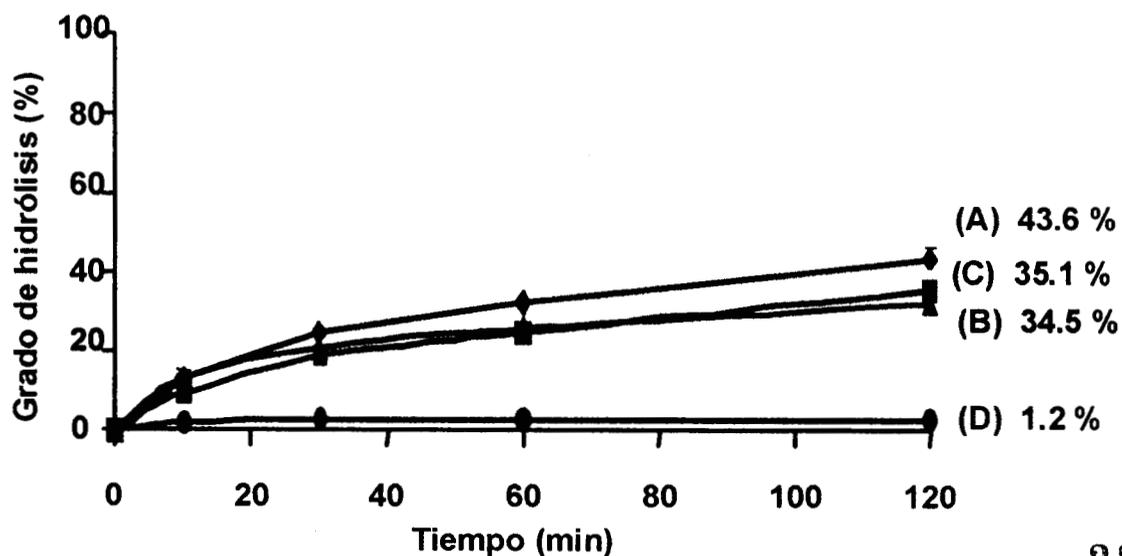


Figura 5.13 Cinética de hidrólisis de SC con Flavourzyme, pH=5.9, T=53°C,
 (A) ◆ S:B=25%, E=80LAPU/g, (B) ▲ S:B=70%, E=80 LAPU/g,
 (C) ■ S:B=40%,E=50 LAPU/g, (D) ● S:B=40%, Sin enzima.

227513

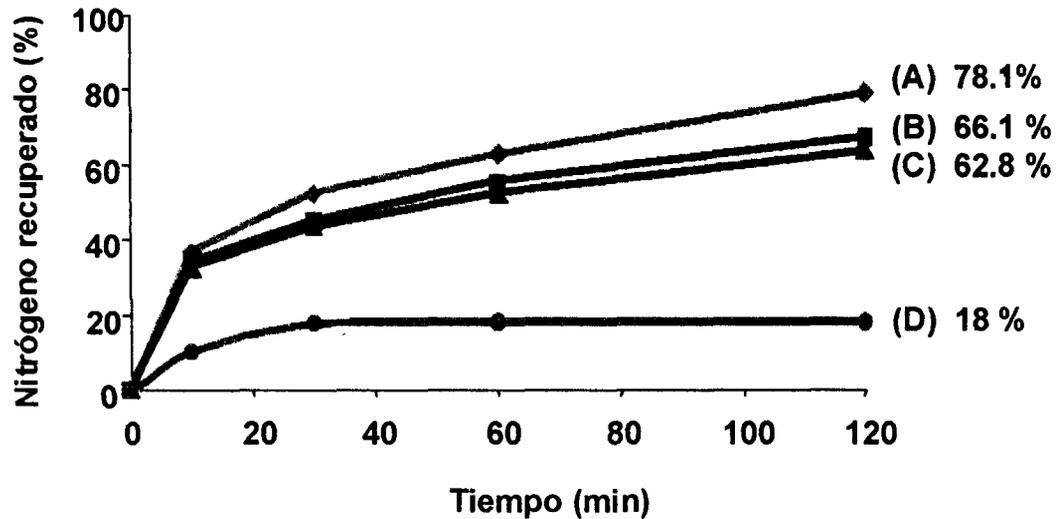


Figura 5.14 Nitrógeno recuperado de SC con Flavourzyme, pH=5.9, T=53°C,
 (A) ♦ S:B=25%, E=80LAPU/g, (B) ■ S:B=70%, E=80 LAPU/g,
 (C) ▲ S:B=40%,E=50 LAPU/g, (D) ● S:B=40%, Sin enzima.

Por otra parte, después de 120 minutos de hidrólisis las condiciones donde se presenta el mayor GH (43.6%) y NR (78.1%), corresponden a la relación sustrato/buffer y concentración de enzima predichas por el modelo matemático (S:B=25% y E=80 LAPU/g). Sin embargo, en estas condiciones se requiere de un 60% más de enzima que la recomendada por el proveedor. Además, la cantidad de buffer utilizado es 60% mayor, por lo que aumenta el gasto energético requerido para el secado del hidrolizado.

Por lo anterior, fue necesario incluir un nuevo parámetro definido como nitrógeno recuperado por unidad enzimática (tabla 5.6). Del análisis de este valor se observa que las condiciones donde es más alto (1.26) se dan en S:B=40 % y E=50 LAPU/g, las cuales coinciden con las recomendadas por el proveedor (Novo).

Para las tres condiciones de hidrólisis, entre los 10 y 30 minutos de hidrólisis es el tiempo donde se observa una mayor distribución de bandas de diversos pesos moleculares. Por lo tanto, éstos péptidos podrán presentar mayores propiedades funcionales y nutricionales (capítulo 2.3.2 y 2.3.3).

5.5. Evaluación de actividad de Flavourzyme

Dependiendo del pH del medio donde se lleve a cabo la hidrólisis con Flavourzyme puede predominar la actividad endopeptidasa (pH 5.9) ó exopeptidasas (pH 7). En las figuras 5.16 y 5.17 se presentan las cinéticas de hidrólisis de GH y NR a pH 5.9 y 7.

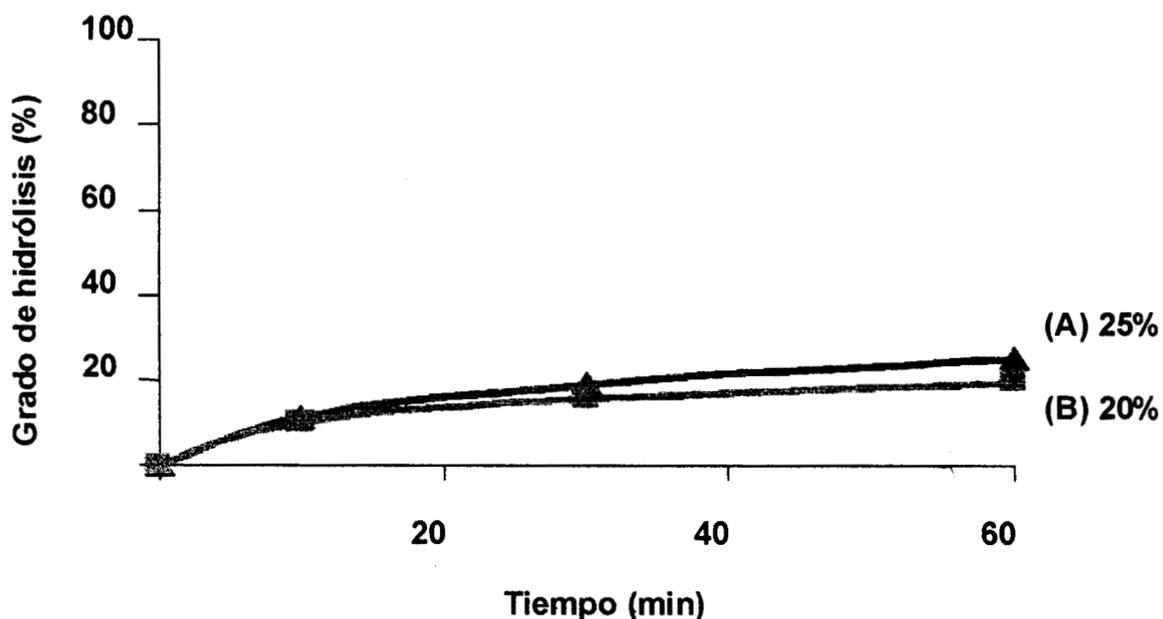


Figura 5.16. Cinética de hidrólisis de SC con Flavourzyme a condiciones de pH donde se promueve la actividad (A) ▲ endopeptidasa (pH 5.9), (B) ■ exopeptidasa (pH 7), T=53°C, S:B=40%, E=50 LPU/g.

El GH después de 60 minutos de hidrólisis fue mayor a pH 5.9 (25%) que a pH 7 (20%), lo cual puede explicarse por una mayor actividad endopeptidasa a pH 5.9 que a pH 7. Sin embargo, el NR a pH 7 fue mayor (69%) que a pH 5.9 (57%), lo que significa que las fracciones peptídicas recuperadas a pH 7 presentaron un peso molecular mayor que las resultantes a 9, y esto influyó en un mayor porcentaje de nitrógeno recuperado.

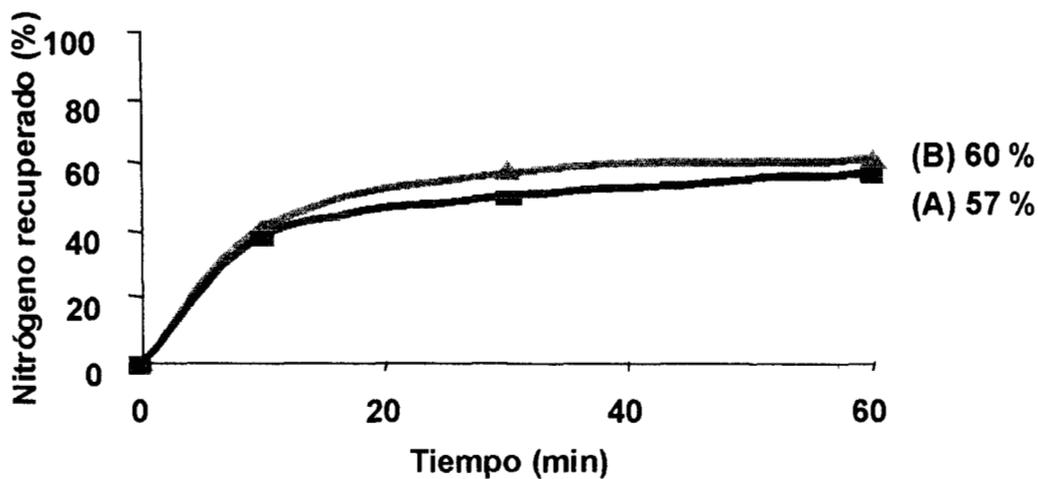


Figura 5.17 Nitrógeno recuperado de SC con Flavourzyme a condiciones de pH donde se promueve la actividad (A) ■ endopeptidasa (pH 5.9) y (B) ▲ exopeptidasa pH 7, T=53°C, S:B=40%, E=50 LAPU/g

Por su parte, el perfil electroforético de las fracciones peptídicas a pH 5.9 muestra una marcada densidad por debajo de 26 kDa (figura 5.18), lo que nos habla de una hidrólisis más extensa que a pH 7, donde se puede observar bandas correspondientes a péptidos de alto peso molecular. Esta tendencia se presenta en el cromatograma de FPLC (figura 5.19), donde la mayor distribución de pesos moleculares corresponde a pH 7.

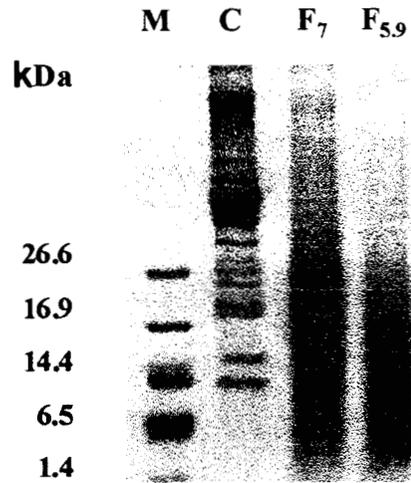


Figura 5.18. Patrón electroforético de las fracciones peptídicas resultantes después de 30 minutos de hidrólisis de SC con Flavourzyme (f), 53°C, 40% S:B, E= 50 LAPU/g, pH 7 y pH 5.9.

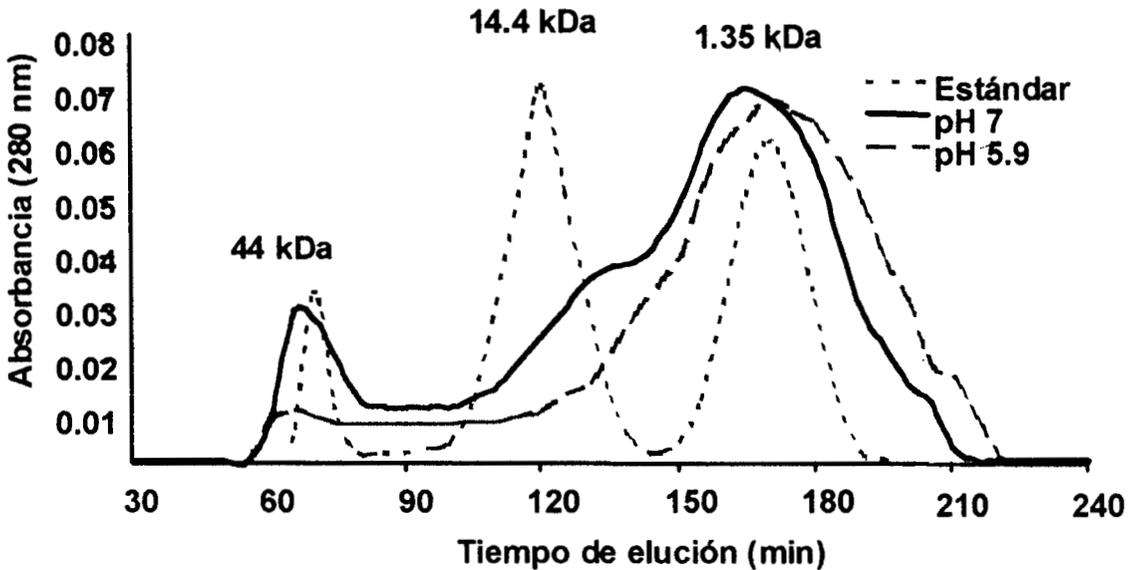


Figura 5.19. Cromatograma de filtración en gel de las fracciones peptídicas resultantes de la hidrólisis de 30 minutos de SC con Flavourzyme (53°C, 40% S:B, 50 LAPU/g) a condiciones donde predomina la actividad exopeptidasa (pH 7) y endopeptidasa (pH 5.9). (Columna empacada con Sephadex G-50, 0.5 ml/min, buffer de fosfatos, estándares: vitamina B12 (1.5 kDa), lisosima (14.4 kDa) y ovoalbúmina (45 kDa).

Finalmente, para caracterizar el producto final que se obtiene después de una hidrólisis de SC con Flavourzyme, fue necesario conocer el patrón electroforético de la fracción insoluble (figura 5.20). Esta permanece como sedimento al final del proceso de hidrólisis y está constituida principalmente por actina y colágeno parcialmente hidrolizados.

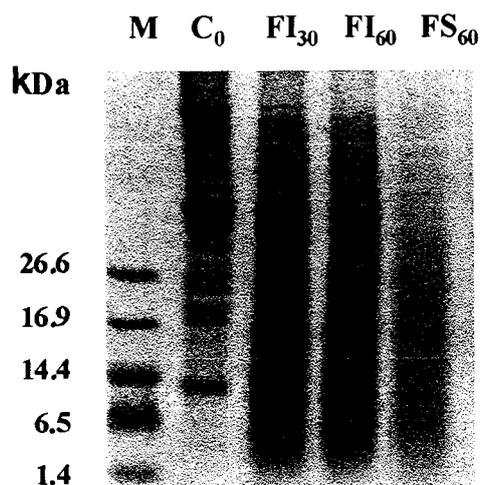


Figura 5.20. Patrón electroforético de la fase soluble (fS) e insoluble (fI) después de 60 minutos de hidrólisis de SC con Flavourzyme a pH 7, 53°C, 40% S:B y 50 LAPU/g.

5.6. Producción y análisis de dos fracciones peptídicas

El objetivo de esta fase del trabajo fue el de separar por ultrafiltración dos fracciones peptídicas: la primera entre 1 y 10 kDa y la segunda mayor de 10 kDa. Se analizaron algunas de sus propiedades funcionales (solubilidad, capacidad de emulsión, índice de actividad emulsificante e índice de estabilidad de emulsión) y su composición de aminoácidos esenciales.

5.6.1 Hidrólisis

A partir del análisis del PPM de las fracciones peptídicas resultantes de la hidrólisis de SC con Flavourzyme (capítulo 5.5), se procedió a realizar una hidrólisis en las siguientes condiciones: pH=7, T=53°C, S/B=40%, E=50 LAPU/g y t=15 minutos.

En la figura 5.21 se presenta el cromatograma del PPM de la fracción soluble inicial antes de la adición de Flavourzyme. Dicha fracción la componen proteínas miofibrilares solubles en soluciones de baja fuerza iónica, productos de autólisis, péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres propios del SC (Sikorski, 1994).

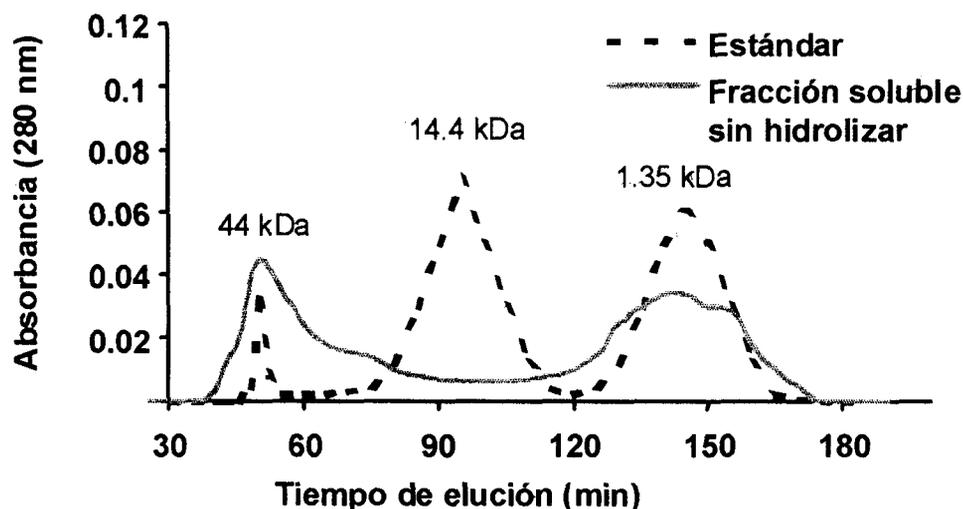


Figura 5.21 Cromatograma de la fracción soluble sin hidrolizar, pH=7, T=53°C, S:B=40%, sin enzima, t = 0 minutos. (Columna empacada con Sephadex G-50, 0.5 ml/min, buffer de fosfatos, estándares: vitamina B12 (1.5 kDa).

En la figura 5.22, se observa el PPM del hidrolizado después de 15 minutos de hidrólisis, donde GH=10.6 % y NR=45%.

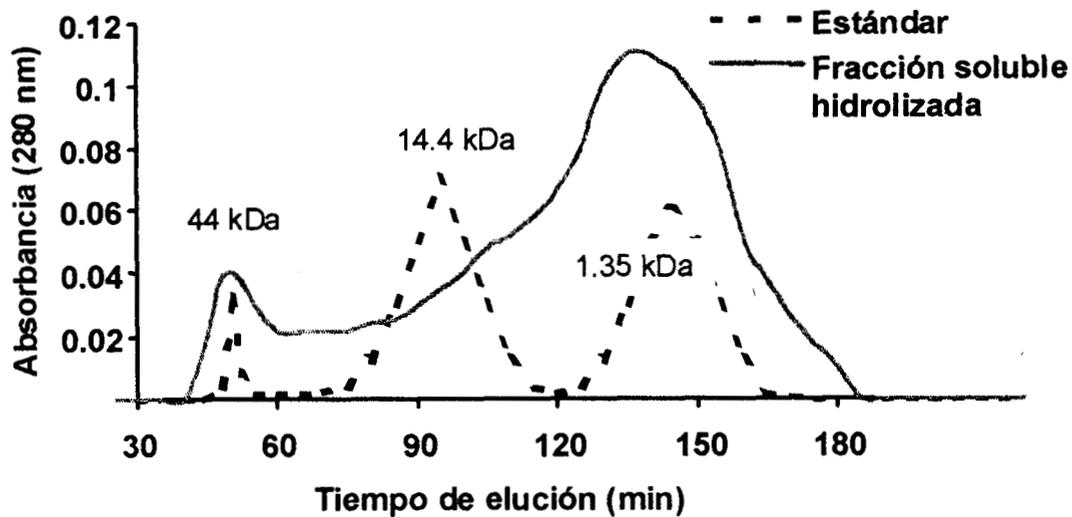


Figura 5.22 Cromatograma de la fracción soluble hidrolizada, pH=7, T=53°C, S:B=40%, E=50 LAPU/g, t = 15 minutos. (Columna empacada con Sephadex G-50. 0.5 ml/min. buffer de fosfatos. estándares: vitamina B12 (1.5 kDa).

5.6.2. Separación

El seguimiento del proceso de separación por ultrafiltración se llevó a cabo a través de cromatogramas de FPLC del filtrado y el retenido. La separación de las fracciones peptídicas con una membrana de 10 kDa, se presenta en las figuras 5.23, 5.24 y 5.25.

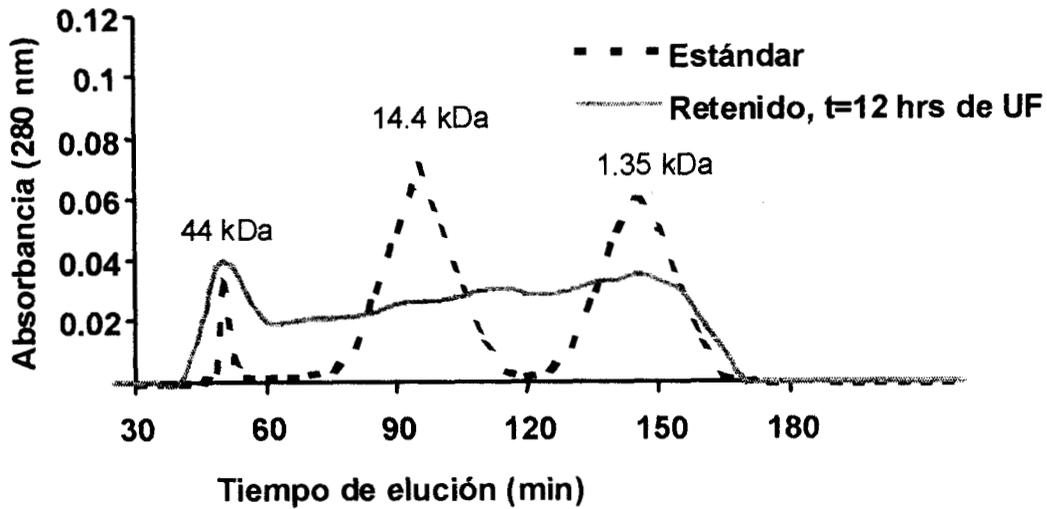


Figura 5.23 Cromatograma del retenido después de 12 horas de ultrafiltración en una membrana de 10 kDa. (Columna empacada con Sephadex G-50, 0.5 ml/min, buffer de fosfatos, estándares: vitamina B12 (1.5 kDa), lysosima (14.4 kDa) y ovoalbúmina (45 kDa).

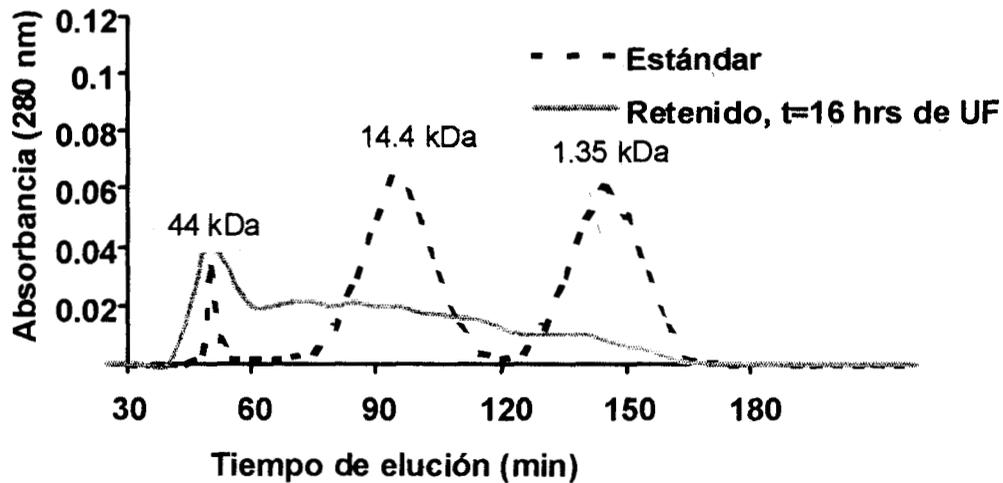


Figura 5.24. Cromatograma del retenido después de 16 horas de ultrafiltración en una membrana de 10 kDa. (Columna empacada con Sephadex G-50, 0.5 ml/min, buffer de fosfatos, estándares: vitamina B12 (1.5 kDa), lysosima (14.4 kDa) y ovoalbúmina (45 kDa).

A las 16 horas de ultrafiltración se obtuvo una separación adecuada de fracciones peptídicas, la mayoría de los péptidos mayores de 10 kDa permanecieron en el retenido y los menores de 10 kDa en el filtrado. Cabe mencionar que en la ultrafiltración no fue posible una completa separación de las fracciones, debido a las características del proceso.

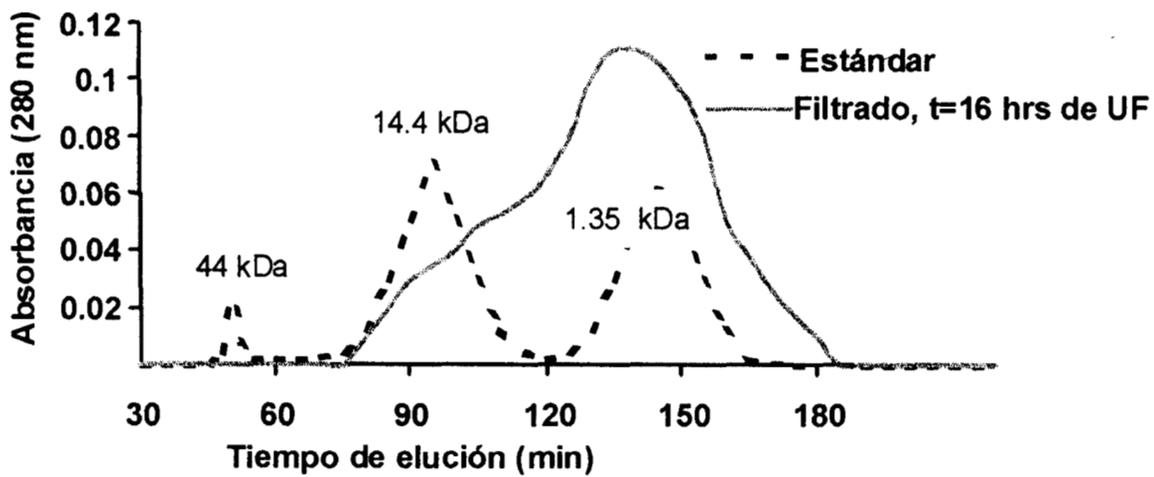


Figura 5.25. Cromatograma del filtrado después de 16 horas de ultrafiltración en una membrana de 10 kDa. (Columna empacada con Sephadex G-50, 0.5 ml/min, buffer de fosfatos, estándares: vitamina B12 (1.5 kDa), lysosima (14.4 kDa) y ovoalbúmina (45 kDa).

Para la eliminación de sales y aminoácidos libres fue necesario una ultrafiltración posterior a través de una membrana de 1 kDa. El seguimiento de la separación de fracciones no fue muy claro debido a que el rango de resolución de la columna de filtración en gel es superior a 1 kDa (figura 5.26). Sin embargo, se optó por detener la filtración después de 20 horas para evitar algún riesgo de contaminación microbiológica.

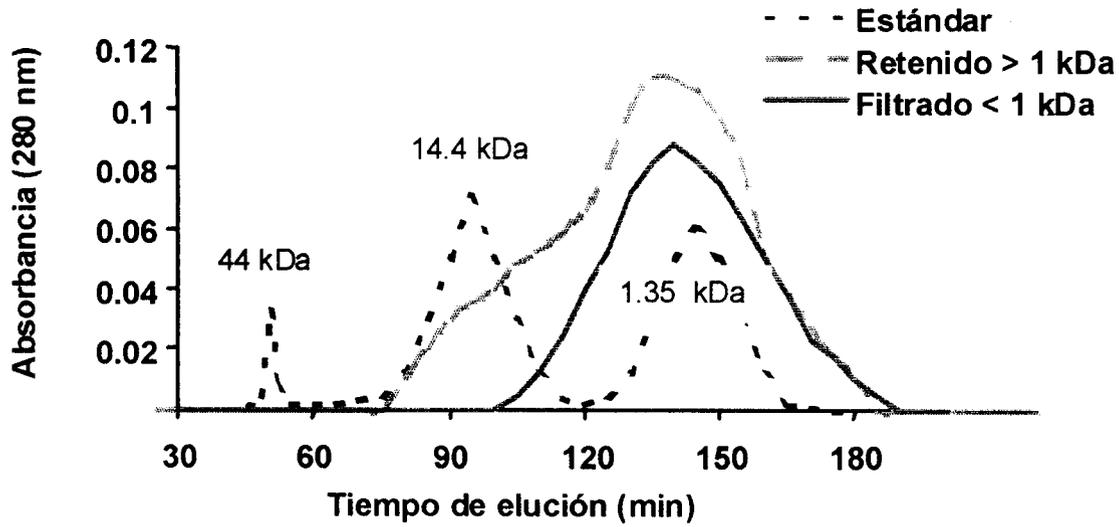


Figura 5.26. Cromatograma del retenido y filtrado después de 20 horas de ultrafiltración en una membrana de 1 kDa. (Columna empacada con Sephadex G-50, 0.5 ml/min, buffer de fosfatos, estándares: vitamina B12 (1.5 kDa), lisosima (14.4 kDa) y ovoalbúmina (45 kDa)).

5.6.3. Liofilización y balance de materia

El balance de proteína del proceso se realizó a partir del peso de cada fracción después de su liofilización (tabla 5.7).

Es importante mencionar, que las sales de fosfatos del buffer donde se llevó a cabo la hidrólisis se restaron del peso de la fracción menor de 1 kDa. Además, la cantidad de Flavourzyme (peso molecular > 20 kDa) utilizada para la hidrólisis se restó de la fracción mayor de 10 kDa.

Tabla 5.7 Balance de proteína de la hidrólisis de SC con Flavourzyme, pH=7, T=53°C, S:B=40%, E=50 LAPU/g, t =15 minutos.

	Peso (g)	Nitrógeno (g)	Proteína (g)	NR (%)
Subproducto de Carpa	640	14.3	89.6	
Fracciones peptídicas				
Mayor de 10 kDa	11.3	1.36	8.5	9.5
Entre 1 kDa y 10 kDa	16.9	1.99	12.4	13.9
Menor 1 kDa	4.8	0.57	3.5	3.9
Total				27.3

En las condiciones de hidrólisis estudiadas el valor teórico de NR es de aproximadamente 45% (figura 5.17). Por lo que es necesario optimizar el proceso principalmente en los pasos de centrifugación y recuperación de la fracción liofilizada.

5.6.4. Propiedades funcionales

El análisis de las propiedades funcionales (solubilidad, capacidad, actividad y estabilidad de emulsión) de las fracciones peptídicas recuperadas (1 a 10 kDa y mayor de 10 kDa) se llevó a cabo a pH 7, con la finalidad de mantener constante esta variable de control que influye en las características funcionales de las proteínas.

5.6.4.1. Solubilidad

Para las fracciones peptídicas recuperadas el porcentaje de solubilidad fue elevado (tabla 5.8). La fracción de 1 a 10 kDa presenta mayor solubilidad (93%) que la fracción arriba de 10 kDa (90%). Lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (Quaglia y Orban, 1987b; Cui y Piggot, 1995) ya que a medida que el tamaño promedio de pesos moleculares disminuye, la capacidad de solubilidad aumenta. Quaglia y Orban (1987b), reportan que con un GH de 20% con Alcalasa, se tiene un hidrolizado de sardina con una solubilidad mayor del 90% en un rango de pH de 2-9.

Tabla 5.8. Solubilidad de las fracciones peptídicas

Fracción	Solubilidad (%)
1 kDa - 10 kDa	93
Mayor de 10 kDa	90

5.6.4.2. Capacidad de emulsión

227613

La mayor capacidad de emulsión (CE) la presentó la fracción arriba de 10 kDa (31.5ml de aceite/100 mg de FP) (tabla 5.9). Quaglia y Orban (1990) obtuvieron un valor de 30 ml de aceite/100 mg de proteína con un hidrolizado de sardina a pH 7 y con un GH de 10%, en cambio, con un GH de 20% fue de 22 ml de aceite/ 100 mg de proteína. En otro estudio de hidrolizados proteicos de subproductos de bacalao,

después de 20 min de hidrólisis con tripsina, el hidrolizado tenía una CE en condiciones neutras de 23.6 g de aceite/g proteína; en este mismo trabajo se reporta una CE de la albúmina de huevo de 31.6 g de aceite/g proteína. Cabe mencionar, que por sus propiedades funcionales la albúmina de huevo es una de las proteínas mayormente utilizadas en la industria alimentaria.

Tabla 5.9. Capacidad de emulsión de las fracciones peptídicas

Fracción	ml aceite /100 mg FP
1 kDa - 10 kDa	27.1
Mayor de 10 kDa	31.5

Por lo tanto, por su CE a pH 7 la fracción peptídica mayor de 10 kDa podría ser utilizada como sustituto de albúmina de huevo en helados, galletas y postres (Miller y Groninger, 1976; Ostrander y col., 1977). Sin embargo, es necesario un análisis microbiológico y sensorial.

5.6.4.3. Índice de actividad emulsificante

En la tabla 5.10 se observa que la fracción peptídica que obtuvo un mejor índice de actividad emulsificante (IAE) fue la fracción mayor de 10kDa (32.8). Este valor fue superior al obtenido a las mismas condiciones para albúmina de huevo (19.9) y para peptona de soya (7.6). Por otra parte, los valores reportados de IAE para diferentes proteínas utilizando una concentración de proteína del 0.5% y pH 6.5 son los siguientes: caseinato de sodio (149) fracción B de proteína de soya (26) y proteína de levadura (8) (Pierce y Kinsella, 1978).

Tabla 5.10. Índice de actividad emulsificante de las fracciones peptídicas

Fracción	IAE (m ² /g)
1 kDa - 10 kDa	28.3
Mayor de 10 kDa	32.8

5.6.4.4. Índice de estabilidad de emulsión

La fracción que presentó un mayor índice de estabilidad de emulsión fue la fracción peptídica mayor de 10 kDa (tabla 5.11).

Tabla 5.11. Porcentaje de aceite coalescido de las fracciones peptídicas

Fracción	Estabilidad de emulsión (%)
1 kDa - 10 kDa	10.0
Mayor de 10 kDa	81.6

Por lo tanto, la fracción peptídica recuperada superior de 10 kDa presenta las mejores propiedades emulsificantes.

5.6.5. Perfil de aminoácidos de las fracciones peptídicas

En la tabla 5.12, se observa que la composición porcentual de aminoácidos esenciales es diferente para cada fracción peptídica..

Tabla 5.12 Composición porcentual de aminoácidos esenciales de las fracciones peptídicas recuperadas

	1 kDa – 10 kDa	> 10 kDa
Isoleucina	6.21	4.17
Leucina	10.90	7.65
Lisina	0.10	6.85
Metionina	1.93	0.98
Treonina	5.68	3.95
Triptofano	*	*
Valina	5.44	2.82
Total (%)	30.26	26.42

La fracción de 1 a 10 kDa presentó un mayor porcentaje de aminoácidos esenciales, tales como leucina, isoleucina, metionina, treonina y valina. El porcentaje total de aminoácidos esenciales (30.26) de esta fracción es superior al de la fracción peptídica mayor de 10 kDa (26.42). Esto puede explicarse por la especificidad de rompimiento de Flavourzyme sobre el SC, que da como resultado una diferente distribución de aminoácidos en cada fracción peptídica. Además, pudo ser ocasionado por la destrucción de aminoácidos durante la hidrólisis ácida de la fracción mayor de 10 kDa.

Los valores reportados de aminoácidos esenciales en otros estudios de hidrolizados de pescado (tabla 5.13) difieren de los obtenidos en las fracciones peptídicas recuperadas, debido a que en estos trabajos no se realizó una separación por peso molecular de fracciones peptídicas.

Tabla 5.13. Composición porcentual de aminoácidos esenciales en hidrolizados de sustratos de origen acuático

	Subproductos de Blanco del Pacífico ¹	Músculo de Tiburón ²	Músculo de Lisa ³	Músculo de Sardina ⁴
Isoleucina	4.30	4.75	4.09	3.87
Leucina	7.16	8.10	4.71	8.41
Lisina	8.33	8.94	7.48	9.66
Metionina	3.02	2.65	-	-
Treonina	5.12	4.59	3.99	4.97
Triptofano	0.14	0.84	0.94	1.22
Valina	4.72	4.50	4.78	5.17
Total (%)	32.79	34.38	25.99	33.3

¹ Benjakul y Morrissey, 1997, ² Diniz Martin, 1996, ³ Baca y col., 1991, ⁴ Quaglia y Orban, 1986

Por lo tanto, las fracciones peptídicas recuperadas a partir de subproductos de carpa y separadas por ultrafiltración, presentaron un alto contenido de aminoácidos esenciales.

6. CONCLUSIONES

1. El mejor método para la cuantificación de GH fue como grupos α -amino terminal.
2. La hidrólisis con Alcalasa produjo un GH y NR superior al obtenido con Flavourzyme, sin embargo, la mayoría de los péptidos resultantes de la hidrólisis con Alcalasa son menores de 5 kDa.
3. A través del análisis de ASR, NR/unidad enzimática, PPM y actividades de Flavourzyme se logro optimizar el proceso de recuperación de proteína en las siguientes condiciones: pH 7, T=53°C, S:B=40% y E=50 LAPU/g.
4. La fracción entre 1 y 10 kDa presentó el mayor porcentaje de aminoácidos esenciales.
5. A partir del subproducto de carpa se recuperó un 9.5% de nitrógeno por ultrafiltración, en forma de péptidos mayores de 10 kDa con propiedades emulsificantes comparables a la de albúmina de huevo.
6. Se optimizó el proceso de hidrólisis enzimática de subproductos de Carpa con Flavourzyme, para la recuperación de fracciones peptídicas con propiedades nutricionales y funcionales.

7. RECOMENDACIONES

1. Es necesario un riguroso cuidado sanitario en la manipulación de las fracciones peptídicas durante su producción, separación, liofilización y congelación, ya que son un excelente sustrato de hongos y bacterias. Para asegurar su calidad sanitaria se recomienda realizar un análisis microbiológico de las fracciones peptídicas obtenidas.
2. Para un análisis más completo de las propiedades funcionales de las fracciones peptídicas recuperadas, es necesario montar un diseño experimental en un rango más amplio de pH, ya que la funcionalidad se ve influenciada por el pH.
3. Para el uso de las fracciones peptídicas menores de 10 kDa en formulas hipoalergenicadas de pescado, sería necesario analizar la antigenicidad del hidrolizado con una prueba de ELISA. Ésta técnica detecta y cuantifica los antígenos en el hidrolizado proteico, el cual tiene la capacidad de ligar los anticuerpos IgE que poseen las personas alérgicas al pescado.
4. Para continuar la búsqueda de las condiciones de hidrólisis donde se obtenga la mayor recuperación de fracciones peptídicas con un perfil de pesos moleculares amplio, se sugiere realizar una cinética enzimática con Flavourzyme manipulando las condiciones de pH. De tal forma que se alterne la actividad endopeptidasa con la exopeptidasa y analizar el perfil pesos moleculares de las fracciones peptídicas resultantes.

8. BIBLIOGRAFIA

- Adler-Nissen J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Protein Chem.* 27(6):1256-1262.
- Adler-Nissen J. (1984). Control of the proteolytic reaction and the level of bitterness in protein hydrolysis processes. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 34B: 215-222.
- Adler-Nissen J. (1986). *Enzymic Hydrolysis of food proteins.* Elsevier Applied Science Publishers. New York.
- Adler-Nissen J. (1993). "Proteasas". *Enzymes in Food Processing.* Edit. Tilak Nagodawithana. Academic Press, Inc.
- Aitken, A. Mackie, I. Merrit, J. y Windsor, M. (1982). *Fish handling and processing.* HMSO Edinburgh.
- A.O.A.C. (1980). *Official Methods of Analysis.* 13^a Edición. Association of Oficial Analytical Chemists. Washington, D.C.
- Anuario Estadístico de Pesca 1999. Instituto Nacional de Pesca (INP), SEMARNAP.
- Archer, M., Ragnarsson j., Tannenbaum S. y Wang D. (1973). Enzymatic solubilization of an insoluble substrate, fish protein concentrate: process and kinetic considerations. *Biotechnol. Bioeng.* 15:181-196.
- Aubes-Dufau I., Seris J y Combes D. (1995). Production of peptic hemoglobin hydrolysates: bitterness demonstration y characterization. *J. Agric. Food Chem.* 43:1982-1988.
- Baca D., Peña-Vera M. and Diaz-Castañeda M. (1991). Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; yield and nutritional value. *J. Food Sci.* 56: 309-314.
- Baek H. y Cadwallader K. (1995). Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. *J. Food Sci.* 60(5): 929-934.
- Badui. S. (1994). *Química de los Alimentos.* Ud. Alhambra Mexicana. pp 125-129
- Benjakul S. y Morrissey T. (1997). Protein hydrolysates from pacific whiting solid wastes. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3423-3430.
- Bohdziewicz, J. (1994). Ultrafiltration of technical proteolytic enzymes. *Process Biochemistry,* 29:109-118.

- Borderías, A. y Montero P. (1988). Fundamentos de la funcionalidad de las proteínas en alimentos. *Rev. Agroquim. Technol. Alim.* 28(2):159-169.
- Boza J., Martínez-Agustin O., y Gil A. (1995). Nutritional and antigenic characterization of an enzymatic whey protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 43:872-875.
- Box, G. y Behnkenn, D. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2(4):455-475.
- Box G., Hunter W. y Hunter J. (1978). *Statistics for experimenters.* John Wiley&Sons. Ins. New York.
- Brown, W.D. (1962). The concentration of myoglobin and hemoglobin in Tuna Flesh. *J. Food Sci.* 27:26-28.
- Cheftel J. (1989). *Proteínas Alimentarias.* Edit. Acribia, España. pp 115-120.
- Dagorn-Scaviner C., Gueguen J. y Lefebvre J. (1987). Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption behaviors. *J. Food Sci.* 2(52):335-341.
- Damodaran, S. (1994). Structure-function relationship of food proteins. In:protein functionality in food systems. Hettiarachy N. y Ziegeler G. Ed. Marcel Dekker Inc., Nueva York, EE.UU.
- Das, K. y Kinsella J. (1990). Stability of foods emulsions: physicochemical role of protein and nonprotein emulsifiers. *Adv. Food Nut. Res.* 34, Kinsella E. Ed. Academic Press, Londres, Gran Bretaña.
- Diniz F. y Martin A. (1996). Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of Dogfish (*Squalus acanthias*) muscle . *Int. J. Food Sci. Tech.* 31:419-426.
- Egan H., Kirk S. y Sawye R. (1993). *Análisis químico de alimentos de Pearson.*Compañía Editorial Continental. pp 20-21.
- Eyal, A., y Bressler E. (1993). Industrial separation of carboxylic and amino acids by liquid membranes: applicability, process considerations, and potential advantages. *Biotechnol. Bioeng.* 41:287-295.
- FAO (1992). *Yearbook of fishery statistics*,vol.73, Roma
- Floros, J. y Chinnan, M. (1994). Liquefying cod fish frames under acidic conditions with a fungal enzyme. *Journal Food Processing Preservation*, 18, 87-101.

- Frazier W. y Westhoff D. (1993). Contaminación, conservación y alteración del pescado y otros alimentos marinos. Microbiología de los alimentos. Zaragoza, España, Ed. Acribia.
- Freitas O, Padovan G., Vileia L , Dos santos J., Dutra de Oiveira J y Greene J. (1993). Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. J. Agric. Food Chem. 41:1432-1438.
- FroKjaer, S. (1994). Use of hydrolysates for protein supplementation. Properties of protein hydrolysates, including solubility under acid conditions and high palatability, make them suitable for use in medical foods and products for general consumption. Food Technol. Octubre: 86-88.
- Garem A., Daufin J., Maubois J. y Leonil J. (1997). Selective separation of amino acids with a charged inorganic nanofiltration membrane: effect of physicochemical parameters on selectivity. Biotechnol. Bioeng., 54:291-302.
- Garrote, R., Coutaz, V., Luna, J., Silva, R. y Bertone R. (1993). Optimizing processing conditions for chemical peeling of potatoes using response surface methodology. J. Food Sci. 58(4), 821-826.
- Gildberg A. y Johansen A. (1995). Growth and survival of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture 138:23-34.
- Grabner, M (1985) An in vitro method for measuring protein digestibility of fish feed components. Aquaculture, 48:97-119
- Haard N. (1992). Protein hydrolysis in seafoods. In seafoods: chemistry, processing technology and quality, (Shahidi and Botta). Blackie Academic & Professional. 10-33.
- Hall G. y Ahmad N. (1992). Functional properties of fish protein hydrolysates. In Fish Processing technology. Hall, G. M. Ed. Blackie Academic & Professional, London: 249-270.
- Hardy W. (1990). Fish hydrolysates: production y use in aquaculture feeds. pp 109-115.
- Harris E. And Angal S. (1992). Protein purification methods: a practical approach. Oxford University Press, U.S.A. pp 18-27, 293-305.

- Hoyle N. y Merrit J. (1994). Quality of fish protein hydrolysed from Herring (*Clupea harengus*) Food Sci. 59: 76-79
- Iguchi T., y Sugita K. (1992). Preparation of peptide-containing food. Patent: 06007188 JP:
- Jay M. (1989). Modern Food Microbiology. D.Van Nostrand Co. New York, U.S.A.
- Jaouen, P, Bothorel, M. y Quéméneur, F. (1990) Treatment of seafood processing effluents through microporus membranes –applications and prospects. Proceedings of the International Congress on Membranes and membrane processess. Chicago, USA.
- Joglekar, A. y May, A. (1987). Product excellence through design of experiments. Cereal foods World, 32(12), 857-868.
- Kagawa K., Fukuhama C., Matsutaka T y Iguchi K. (1994). Adipose cell differentiation-inhibiting peptide and adipose cell differentiation-inhibiting agent containing the peptide as active ingredient. Patent 06293796 JP A.
- Kaushik S. (1995). Nutrient requirements, supply and utilization in the context of carp culture. Aquaculture. 129:225-241.
- Kimura, S. y Tanaka, H. (1986). Partial characterization of muscle collagens from prawns and lobster. J. Food Sci. 51:330-332, 339.
- Kretzschmar, U. (1992). Funktionelle sigenschaften von muskel proteinen. Fleischwirstch. 72(6):905-911.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleave of structural proteins during assembly of head of bactiophage T4, Nature, 227:680-685.
- Lee K. y Warthesen J. (1996). Preparative methods of isolating bitter peptides from cheddar cheese. J. Agric. Food Chem. 44: 1058-1063.
- Lahl W. y Braw S. (1994). Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. Food Tech. October : 68-71.
- Lee P. y Lawrence A. (1997). Digestibility in crustacean nutrition, Advances in world Aquaculture. 6, 194-260.
- Lees R. (1985). Análisis de los alimentos. Métodos analíticos y de control de calidad. Edit Acribia. Pp 179.

- Linder M. y Fanni J. (1995). Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis. *Food Sci.* 60(5): 949-958.
- Lindesrstrom-Lang, K. (1952). Proteins and enzymes. III. The initial stages in the breakdown of proteins by enzymes. *Lane medical lectures, Stanford University Press, California.* Vol VI, pp 53-72.
- Loosen, P., Bressollier, P., Julien R., Pejoan C. Y Verneuil B. (1994). Method for preparing an enzymatic hydrolysate. *United States Patent.* 5356637.
- Lowry, O., Rosebrough N., Farr A. y Randall R. J. *Biol.*(1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biological Chemistry.*, 193, 265.
- Mahmoud M. (1994). Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Tech.* October: 89-94.
- Miller R. y Groninger H. (1976). Functional properties of enzyme modified acyulated fish protein derivatives. *J. Food Sci.*, 41:268-272.
- Mohr, V. (1978). Fish protein concentrate production by enzymic hydrolysis. In: *Biochemical aspects of New protein food.* 11th Meeting of the federation of European Biochemical Societies, Vol. 44 (edited by Adler-Nissen, J., Eggum L., Muck y Olsen H. Pp 53-62. Oxford: Pergamon Press.
- Morr C. (1985). Study to develop a standadized food protein solubility procedure. *J. Food Sci.* 50:1715-1718.
- Mietsh F., Fehér J. y Halász A. (1989). Investigation of functional properties of partially hydrolyzed proteins. *Die Nahrung* 33(1), 9-15.
- Myers, R.H. (1971) *Response Surface Methodogy.* Allin And Bacon, Ins. Boston
- Nakajima M., Shoji T. y Nabetani H. (1992) Proteass hydrolysis of water soluble fish proteins using a free enzyme membrane reactor. *Process Biochemistry.* 27:155-160.
- Ney K. (1979). Bitterness of peptides: amino acid composition and chain length. *ACS Symp. Ser.* 3:470-475.
- Nishikawa, F. (1983) Japanese Patent 135450, 205569, 205570.
- Nishikawa, F. (1985) Japanese Patent 60027359.
- Noboru I. y Tokuyasu K. (1997). Debittering of protein hydrolysates using *Aeromonas caviae* aminopeptidase. *J. Agric. Food Chem.* 45(3): 543-545.

- Nouchi R., Tawarazaka Y., Matsuo Y. e Iwamoto M. (1994) Odorless or low-odoriferous component from fish-and-shellfish peptide, its production and external or internal preparation containing the same. Patent: 06293796 JP A.
- Ottesen, M. y Svendsen I.(1970). The subtilisins. Meth. Enzymol. 19:199-215.
- Ostrander J., Nistrom P., y Martinsen C. (1977). Utilization of a fish protein isolate in whipped gelatin desserts. J. Food Sci., 42:559-560.
- Panyam D. y Kilara A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. Trends in Food Sci. Tech. April: 120-125.
- Parnham, C. And Davis R. (1995). Protein recovery from cell debris using rotary and tangential crossflow microfiltration. Biotechnol. Bioeng. 47:155-164.
- Pearce K. y Kinsella J. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. J. Agric. Food Chem., 26:716-723.
- Penke, B., Ferenczi R. Y Kovacz K. (1974). A new acid hydrolysis method for determination of tryptophan in peptides and proteins. Analyt. Biochem., 60:45-50.
- Peterson, G.L 1983.. Determination of Total Protein. Meth Enzymology 91: 95-121.
- Pigott, G. M. (1986). Surimi: the high tech rae material for fish flesh. Food Rev. Int. 2:213-246.
- Protein Recovery (1998), Inc. 482 N. Fleet St. P.O. Box 236 Hammond, OR 97121. USA.
- Quaglia G. y Orban E. (1987a). Enzymic solubilisation of protein of Sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteasas. J. Sci. Food Agric. 38: 263-269
- Quaglia G. y Orban E. (1987b). Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from Sardine (*Sardina pilchardus*) J.Sci. Food Agric. 38:271-276.
- Quaglia G. y Orban E. (1990). Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of Sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysates. J. Food Sci. 55:1571-1573.
- Quaglia G. y Paoletti , F. (1988) Removal of small peptides from enzymatic hydrolysate of fish protein. Chim. Oggi. 9, 67-69.

- Roberts, P. y Zaloga, G. (1994) Dietary bioactive peptides. *New Hor.* 2,237-243.
- Sato, K. Yoshinaka, R. Sato, M and Sshimizu, Y (1986) Collagen content in the muscle of fishes in Association with their swimming movement and meal texture. *Bull. Japan Soc. Sci. Fosh.* 52:1595-1600.
- Schagger H y Jagow G, 1987. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa *Analyt. Biochem.* 166:368-379.
- Siemensma A. y Weijer W. (1993). The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. *Trends Food Sci. Tech.* 4:16-21.
- Shahidi, F., Naczki, M., Pegg, R., y Synowiecki, J. (1991). Chemical composition and nutritional value of processing discards of Cod (*Gadus morhus*). *Food Chem.* 42:145-151.
- Shahidi, F., Synowiecki, J., Dunajski, E. And Chong, X. (1992). Non-protein nitrogen compounds in Harp Seal (*Phoca groenlandica*) meal. *Food Chem.* 46:407-413.
- Shahidi F. y Synowiecki J. (1994). Proteolytic hydrolysis of muscle proteins of Harp Seal (*Phoca groenlandica*). *J. Agric. Food Chem.* 42:2634-2638
- Sikorski Z. (1994). The contents of proteins and other nitrogenous compounds in marine animals. *Seafood Proteins*. Sikorski Z., Sun Pan B. y shahidi F. pp 9. Chapman & Hall Inc. New York, NY.
- Surowka K. y Fik. (1994). Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads: application of pepsin to the production of protein hydrolysate. *J. Sci. Food Agric.* 65:289-296.
- Swift, C., Lockett C. Y Fryar A. (1961). Comminuted meat emulsion –the capacity of meats for emulsifying fats. *Food Technol.* 15(1):468.
- Thompson, D. (1981). Response surface experimentation. *J. Food Processing and Preservation*, 6, 155-188.
- Vargas H. 1989. Factoriales fraccionados y superficie de respuesta (un enfoque unificado). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. México.
- Vega, R. (1987). Fractionation and concentration of fish protein hydrolysates. PhD Thesis, Reading University. UK.
- Vegarud G. (1989). The level of bitternes and solubility of hydrolysates produced by controlled proteolysis of caseins. *J. Dairy Res.* 56: 373-379.

- Ward, O. (1983). Proteinases. In: Microbial enzymes and biotechnology. Fogarty, ed. Elsevier Science Publ., London. pp. 251-317.
- Webb, K. E., Jr. 1990. Intestinal Absorption of protein hydrolysis product. A review. J. Anim. Sci, 68,3011-3022.
- Wilding, P., Lillford J. y Regenstein J. (1984). Functional properties of protein in foods. J. Chem. Tech. Biotechnol. 34B: 182-189.
- Zaitsev, V., Kizeevetter, I., Lagunov, L. Makarova. (1969). Fish Curing and Processing. Moscow: MIR Publishers.

Anexo 1

I. Curva estándar de tirosina

La curva estándar que se utilizó en el método de péptidos solubles en TCA 0.3 M se realizó con tirosina, en la siguiente forma:

- Se preparó una solución patrón de tirosina con una concentración de 3 mg de tirosina/ml de TCA 0.3 M
- A partir de la solución patrón se realizaron las siguientes diluciones: 2.7, 2.4, 2.1, 1.8, 1.5, 1.2, 0.9 y 0.3 mg de tirosina/ml de TCA 0.3 M.
- Se transfirió una alícuota de 0.25 μ l a un tubo de 5ml, donde se le adicionó 0.225 ml de agua destilada, 1.25 ml de NaOH 0.5 N y 0.25 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu.
- La mezcla se agitó inmediatamente y se incubó a 30°C por 15 minutos,
- Se leyó la absorbancia de cada muestra a 578 nm y los valores obtenidos se ajustaron a una recta. El coeficiente de correlación fue mayor de 0.99. La curva patrón característica se muestra en la figura 1A.

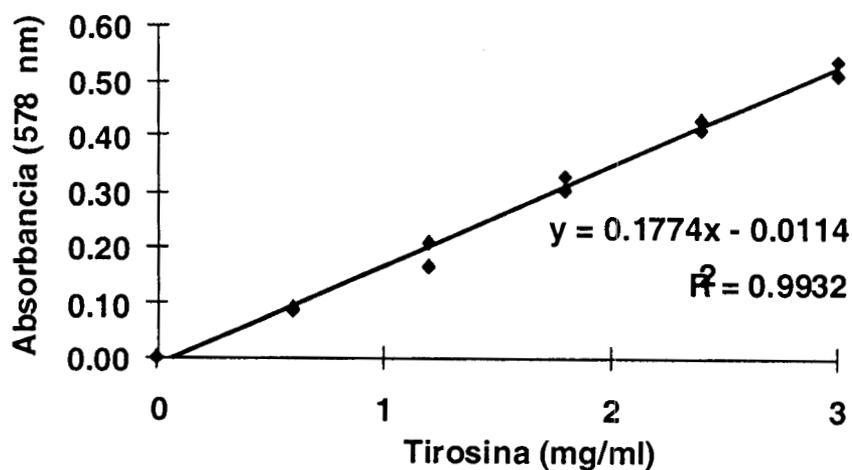


Figura 1A. Curva estándar de Tirosina.

II. Curva estándar de L-leucina.

La curva estándar que se utilizó en el método de α -amino terminal fue con L-leucina:

- Se preparó una solución patrón de L-leucina 3 mM en SDS 1%.
- A partir de la solución patrón se realizaron las siguientes diluciones en SDS 1%: 3, 2.25, 1.5 y 0.75 mM.
- En tubos ámbar de 2 ml con rosca, se colocaron 1 ml de buffer de fosfatos (pH 8.2), 63 μ l de la muestra y 0.5 ml de TNBS al 0.01%.
- La mezcla se agitó inmediatamente en un vórtex y se conservó en un baño de agua (Lauda[®]) a 50°C durante 30 minutos, en completa oscuridad.
- Para finalizar la reacción se adicionó 1 ml de sulfito de sodio 0.1 N.
- Se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 minutos y se midió la absorbancia a 420 nm, los valores obtenidos se ajustaron a una recta. El coeficiente de correlación fue mayor de 0.99. La curva patrón se muestra en la figura 2A:

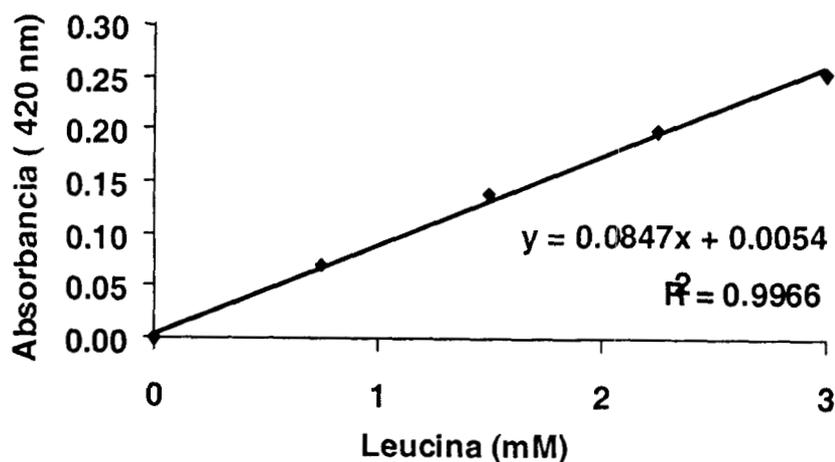


Figura 2A. Curva estándar de L-leucina

Anexo 2

I. Electroforésis para proteínas de alto peso molecular (Laemmli, 1970).

Las soluciones utilizadas fueron las siguientes:

Solución A. (Solución Stock de acrilamida)

29.2 g de acrilamida (BIO-RAD®)

0.8 g de bis-acrilamida (BIO-RAD®)

Solución B. (Buffer de separación 4x)

75 ml de Tris-Hcl 2M (pH 8.8)

4 ml de SDS al 10% H₂O (BIO-RAD®)

Solución C. (Buffer concentrador 4x)

50 ml de Tris-Hcl 1 M(pH 6.8) (BIO-RAD®)

4 ml de SDS al 10%

46 ml de H₂O

Solución D. (Persulfato de amonio al 10%)

0.5 g de persulfato de amonio (BIO-RAD®)

5ml de H₂O

Solución E. (Buffer de electroforesis)

3 g de Tris(BIO-RAD®)

14.4 g de glicina(BIO-RAD®)

1 g de SDS

Agua suficiente para 1 litro.

Solución F. (Buffer de muestra 5x)

0.6 ml de Tris-HCl 1M (pH 6.8)
 5 ml de glicerol al 50% (Sigma®)
 2 ml de SDS al 10%
 0.5 ml de 2-mercaptoetanol (BIO-RAD®)
 1 ml de azul de bromofenol al 1%(BIO-RAD®)
 0.9 ml de H₂O

Solución G. (Azul de Coomasie, solución teñidora)

1 g de azul de Coomasie R-250 (BIO-RAD®)
 450 ml de metanol
 450 ml de H₂O
 1000 ml de ácido acético glacial.

Solución H. (azul de Coomasie, solución desteñidora)

100 ml de metanol
 100 ml de ácido acético glacial
 800 ml de H₂O

La preparación del gel de separación fue la siguiente:

Solución A	x/3 ml
Solución B	2.5 ml
H ₂ O	(7.5 -x/3) ml
Persulfato de amonio al 10%	50 µl
TEMED	5 µl

 Volumen total 10 ml

Para este caso x= 12

- a) Se mezclaron las soluciones A, B y el agua. La mezcla se desgasificó durante 15 minutos, posteriormente se adicionó la solución de persulfato de amonio y el TEMED.
- b) Esta solución se colocó en una cámara de electroforesis, la cual se armó según especificaciones del fabricante. Se dejó polimerizar durante 30 minutos. Pasado este tiempo se procedió a preparar el gel concentrador de acuerdo a la siguiente tabla:

Solución A	0.670 ml
Solución C	1 ml
H ₂ O	2.3 ml
Persulfato de amonio al 10%	30 µl
TEMED	5 µ

Volumen final	4 ml

- c) Se mezclaron las soluciones A, C y el agua. La solución resultante se desgasificó durante 15 minutos. Posteriormente se adicionó la solución de persulfato y el TEMED.
- d) La mezcla se vació a la cámara de electroforesis y se insertó cuidadosamente el peine para formar los carriles donde correrán las muestras de proteína. El gel se dejó polimerizar durante 30 minutos.
- e) Se removió cuidadosamente el peine y los geles se ensamblaron con el electrodo para enseguida colocarse dentro de la cámara de electroforesis, adicionando el buffer de electroforesis dentro y fuera de la cámara.
- f) Las muestra de proteína se prepararon mezclando 20 µl de muestra con 5 µl de la solución F. Por otra parte, 10 µl de marcadores de alto peso molecular (BIO-RAD®) se mezclaron con 5 µl de la solución F. Todas las muestras se sometieron a una ligera centrifugación con el fin de homogeneizarlas adecuadamente.
- g) Las muestras se introdujeron a los carriles de electroforesis con ayuda de una jeringa Hamilton.

- h) El gel se corrió a un voltaje constante de 150 v durante una hora aproximadamente.
- i) Pasado este tiempo se procedió a desteñir el gel de la siguiente manera: el gel se puso en contacto con la solución G durante 30 minutos y posteriormente se lavó repetidas veces con la solución H para desteñir.

II. Electroforésis para péptidos (Schagger y Jagow, 1987)

En la tabla siguiente se presenta la composición de las soluciones stock para la preparación de los buffers y geles de electroforésis para separar péptidos de bajo peso molecular:

	Tris (M)	Tricina (M)	pH	SDS (%)
Buffer del ánodo	0.2	-	8.9 ^a	-
Buffer del cátodo	0.1	0.1	8.25 ^b	0.1
Buffer del gel	3	-	8.45 ^a	0.3

^aAjustado con HCl

^bNo es necesario la corrección de pH, el cual es alrededor de 8.25

Mezcla de acrilamida/bis-acrilamida	Porcentaje de acrilamida (w/v)	Porcentaje de bis-acrilamida (w/v)
49.5 % T, 3% C	48	1.5
49.5 % T, 5% C	46.5	3

La composición de los geles se presenta a continuación:

	Gel concentrador 4 % T, 3 % C	Gel espaciador 10% T3 % C	Gel separador 16.5 %, 6%C, Urea 6 M
49.5% T, 3% C	0.5 ml	1ml	-
49.5 T, 6 % C	-	-	3.3 ml
Buffer del gel	1.55	1.65 ml	3.3 ml
Urea			3.6 g
Agua	4.2 ml	2.35 ml	3.3 ml

- a) El gel separador se desgasificó por 15 minutos y se adicionó 35 μ l de persulfato de amonio al 10% y 5 μ l de TEMED.
- b) El gel espaciador se desgasificó por 15 minutos y se adicionó 20 μ l de persulfato de amonio al 10% y 5 μ l de TEMED.
- c) Ambos geles se prepararon y polimerizaron al mismo tiempo.
- d) Se adicionó el gel separador a la cámara de electroforesis e inmediatamente después el gel espaciador. Este último se cubrió con una capa de agua.
- e) El gel concentrador se desgasificó y se adicionó 50 μ l de persulfato de amonio al 10% y 5 μ l de TEMED.
- f) Se reemplazó el agua con el gel concentrador y se insertó cuidadosamente el peine. Se dejó polimerizar durante 30 minutos.
- g) Se removió el peine y los geles se ensamblaron con el electrodo para enseguida colocarse dentro de la cámara de electroforesis, Los geles se dejaron durante 12 horas en refrigeración en el buffer del ánodo.
- h) Las muestra de proteína se prepararon mezclando 20 μ l de muestra con 5 μ l de la solución F. Por otra parte, 10 μ l de marcadores de bajo peso molecular (BIO-RAD®) se mezclaron con 5 μ l de la solución F. Todas las muestras se sometieron a una ligera centrifugación con el fin de homogeneizarlas adecuadamente.

- i) Las muestras se introdujeron a los carriles de electroforésis con ayuda de una jeringa Hamilton.
 - j) La corrida inicio a 30V por 15 minutos y después se aumentó el voltaje a 75V por 3 horas
 - k) Una vez terminada la electroforésis, las bandas de proteina se fijaron con una solución conteniendo 50% de metanol y 10% de ácido acético por 30 minutos.
 - l) Se tiñieron con 0.025 % de azul de Coomasie en ácido acético al 10% por 1 hora.
 - m) Para desteñir se utilizó ácido acético al 10 % por 2 horas en agitación constante y renovando la solución constantemente.
-

