



División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Producción de hidrolizados proteicos a partir de
subproductos pesqueros y agrícolas

T E S I S

para obtener el grado de

Doctor en Biotecnología

P R E S E N T A

M. en B. Marco Polo Carballo Sanchez

Directora de tesis

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Asesores

Dr. Miquel Gimeno Seco

Departamento de Alimentos y Biotecnología

Facultad de Química, UNAM. México, D.F.

Dr. George M. Hall

Centre for Sustainable Development

University of Central Lancashire Reino Unido

Ciudad de México, 18 de abril de 2016

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros y en la Planta Piloto 10 del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamientos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACYT No. 237292) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Secretaría de Economía (FINNOVA/CONACYT No. 224962).

Ciudad de México, 18 de abril de 2016

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis:

“Producción de hidrolizados proteicos a partir de subproductos pesqueros y agrícolas”

Que presenta:

M. en B. Marco Polo Carballo Sánchez

Comité Tutorial

Directora de tesis

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto de Procesamiento de Desperdicios Orgánicos, Ciudad de México

Asesores

Dr. Miquel Gimeno Seco


Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM. Ciudad de México.

Dr. George M. Hall


Centre for Sustainable Development, University of Central Lancashire, Reino Unido.

H. Jurado:

Presidente: Miquel Gimeno Seco



Secretario: Claudia Patricia Larralde Corona



Vocal: Zaizy Rocha Pino



Vocal: Juan Gabriel Viguera Ramírez



Agradecimientos

A la Dra. Keiko Shirai por haber dirigido este trabajo, por la dedicación hacia sus alumnos, por su paciencia y por ser un ejemplo de perseverancia y tenacidad.

Al Dr. Miquel Gimeno por su apoyo en la realización de los experimentos de esta tesis.

Acknowledge to George Hall, PhD. for his valuable advice and patience despite the distance.

Al Dr. José Carmen Ramírez, por su valiosa colaboración en diversas determinaciones.

A la Dra. Gisela Ríos por su valiosa colaboración en el análisis de aminoácidos.

A la Dra. Zaizy Rocha por sus valiosos comentarios, por el apoyo en el laboratorio y su amistad.

A la Dra. Patricia Larralde por sus valiosos comentarios en la revisión de la tesis.

Al Dr. Gabriel Vigueras por la revisión de la tesis y su amistad desde mi inicio en el laboratorio.

A la Dra. Neith Pacheco por su apoyo desde mi inicio en el laboratorio y por su amistad.

Al Dr. Alberto López por su apoyo en técnicas cromatográficas y su amistad.

Al M. en B. Raúl Reyes por su asesoría en técnicas electroforéticas y su amistad.

A la Dra. Carmina Montiel por su apoyo con mi trabajo en el laboratorio 314.

Al Dr. Humberto González y a la M. en C. Ingrid Camarena por su apoyo.

A la Dra. Alejandra Serrato y el laboratorio divisional de biología molecular por su apoyo.

Al Sr. Juan Manuel Pérez y a la Sra. Clemencia Robles por su apoyo desde la coordinación de laboratorios de docencia de CBS.

Al Ing. Braulio Cusi, al Ing. Jaime Caballero y a todo su equipo de tecnología de la información por su apoyo y amistad.

A la Dra. Diana Alonso por su amistad desde mi inicio en el laboratorio.

A la Dra. Violeta Ugalde por su apoyo y amistad.

A mis compañeros de generación del doctorado por su apoyo y solidaridad.

A los integrantes del laboratorio 314 del conjunto E de la facultad de química: Jesús, Lidia, Lalo, Mary, Isabel, Ale, Jonathan, Nidia.

A todos los integrantes del laboratorio de Biopolímeros a lo largo del tiempo: Raquel, Ivana, Carmen, Jesús, Mariana, Angie Espíndola, Angie Ramos, Rosario, Jorge Barrera, Iris, Lety, Jimena, Itzel, qué bueno que hemos sido muchos.

A Lupita, Rigo, Monse, Rut y Facundo.

A mi familia: mi hermana Andrea, mi mamá Sofía y todas sus hermanas: Tere, Eva, Lupe, Laura y Ale. A mi abuela Felicitas. A mis tíos Andrés, Carlo y Ahuber. A todos mis primos, qué bueno que son muchos.

A Sabina Carvente, por su apoyo incondicional.

Contenido

Índice de tablas.....	8
Índice de figuras.....	9
Índice de ecuaciones	12
Abreviaturas utilizadas en el texto	13
Resumen.....	14
Abstract	16
1. Revisión bibliográfica	18
<i>1.1 Residuos de la actividad pesquera y agrícola.....</i>	<i>18</i>
<i>1.2 El radical estable DPPH.....</i>	<i>22</i>
<i>1.3 Péptidos con actividad antihipertensiva</i>	<i>23</i>
2. Justificación.....	25
3. Objetivo general	27
4. Objetivos particulares.....	27
5. Hipótesis.....	27
6. Materiales y métodos	28
<i>6.1 Desperdicios de la industria pesquera.....</i>	<i>28</i>
<i>6.2 Fuente de carbono.....</i>	<i>28</i>
<i>6.3 Determinación de las proporciones de desperdicios de atún en la mezcla para la FAL.....</i>	<i>28</i>
<i>6.4 Determinación de cantidad de cultivo iniciador.....</i>	<i>29</i>

6.5	<i>Determinación de concentraciones de papaya como fuente de carbono para las bacterias lácticas</i>	30
6.6	<i>Fermentaciones en un reactor de columna de lecho empacado</i>	30
6.7	<i>Análisis microbiológico</i>	31
6.8	<i>Caracterización química de los hidrolizados proteicos</i>	31
6.9	<i>Determinación de azúcares y ácidos orgánicos contenidos en el ensilado mediante cromatografía de líquidos de alta resolución</i>	31
6.10	<i>Determinación de α-aminoácidos y el grado de hidrólisis (GH)</i>	32
6.11	<i>Determinación de digestibilidad proteica in vitro</i>	33
6.12	<i>Determinación cuantitativa de aminoácidos contenidos en la FAL</i>	33
6.13	<i>Fraccionamiento de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares en los hidrolizados proteicos</i>	34
6.14	<i>Distribución de los pesos moleculares de los hidrolizados proteicos mediante electroforesis desnaturante de Tricina</i>	34
6.15	<i>Actividad antirradicalaria con el radical DPPH</i>	35
6.15.1	<i>Determinación espectrofotométrica</i>	35
6.15.2	<i>Determinación mediante resonancia paramagnética electrónica (RPE)</i>	36
6.16	<i>Pasteurización de las muestras</i>	37
6.17	<i>Fraccionamiento y purificación de péptidos</i>	37
7	<i>Resultados y Discusión</i>	40
7.1	<i>Proporción de fracciones de desperdicios de atún</i>	40

7.2 Efecto de la concentración de la papaya en la acidificación en la fermentación ácido láctica (FAL).....	43
7.3 Efecto del nivel de inóculo en la FAL.....	47
7.4 Parámetros de la fermentación.....	50
7.5 Digestibilidad in vitro.....	53
7.6 Actividad antirradicalaria (AAR).....	56
7.8 Pasteurización de muestras.....	70
7.9 Relación de la AAR con la hidrólisis proteica.....	71
7.10 Purificación de péptidos con AAR.....	76
7.11 Determinación de peso molecular por cromatografía de exclusión y purificación de péptidos.....	82
8. Conclusiones.....	87
9. Perspectivas.....	88
10. Artículo publicado.....	89
11. Presentaciones en simposios y congresos derivadas del trabajo de tesis.....	99
12. Referencias.....	100
13. Anexo.....	108

Índice de tablas

Tabla 1. Constantes cinéticas del ácido láctico en desperdicios de atún con 10% (p/p) de melaza añadida para la producción de hidrolizados proteicos con inóculo de <i>Lactobacillus plantarum</i>	49
Tabla 2. Valores de IC ₅₀ obtenidos a partir del ajuste Probit del análisis de las fracciones proteicas extraídas de la FAL con papaya y melaza como fuentes de carbono.....	58
Tabla 3. Valores de IC ₅₀ obtenidos a partir del ajuste Probit del análisis la FAL de papaya y melaza como fuente de carbono por el método espectrofotométrico.	60
Tabla 4. Secuenciación del péptido obtenido del fraccionamiento de proteínas de la FAL en el t=72h.	80

Índice de figuras

- Figura 1. Esquema transversal de la anatomía del atún (*Thunnus albacares*), mostrando algunos de los productos y subproductos del procesamiento (Huda Herpandi y col, 2011). 20
- Figura 2. Criterios empleados para seleccionar las proporciones de carne oscura: vísceras: cabezas, huesos y aletas (CO : V : CHA) expresados como máxima capacidad amortiguadora (β_{max}), actividad de proteasas y contenido de cenizas. 42
- Figura 3. Determinación de pH y ATT de FAL con 5% de *Lactobacillus plantarum* como cultivo iniciador y con concentraciones de papaya de 10%, 20%, 30% y 50% como fuente de carbono. 45
- Figura 4. Representación tridimensional del tiempo de producción de AL de las fermentaciones inoculadas con 5% (p/p) de *L. plantarum* y variaciones de los niveles de papaya. 46
- Figura 5. Perfil de producción de ácido en las fermentaciones y ajustado al modelo de Gompertz con 10% (p/p) de melaza como fuente de carbono variando el nivel de inóculo 5, 10, 20 (% v/p) y con 5 % (p/p) de inóculo y con 30% (p/p) de papaya 48
- Figura 6. FAL con papaya al 30% (p/p) y melaza como fuente de carbono, determinaciones de a) azúcares y ácidos orgánicos determinados por HPLC 52
- Figura 7. Digestibilidad *in Vitro* de hidrolizados proteicos a lo largo de la FAL 53
- Figura 8. Actividad proteasa neutra de FAL de papaya-glucosa y de glucosa como fuente de carbono. 54
- Figura 9. Proteína soluble presente en la FAL con papaya y melaza como fuente de carbono. 55
- Figura 10. Análisis de actividad antirradicalaria de las fracciones proteicas extraídas de la FAL con papaya y melaza como fuente de carbono. 57
- Figura 11. Análisis de actividad antirradicalaria de la FAL con papaya y melaza como fuente de carbono. 59
- Figura 12. Valores de actividad antirradicalaria en la FAL con diferentes fuentes de carbono representadas como a) papaya-glucosa y b) glucosa. 61

- Figura 13. Actividad antirradicalaria de hidrolizados proteicos determinados por EPR: a) espectros de EPR en el intervalo de concentraciones para la determinación del IC_{50} al ajustar datos a un modelo Probit durante la duración de la fermentación. b) EPR de los ingredientes de la fermentación al tiempo inicial. 64
- Figura 14. Electroferograma SDS-PAGE de las fracciones proteicas del FAL donde se representan el control a las 0h, las fracciones sarcoplásmicas, miofibrilares y miofibrilares concentradas con una membrana con corte de 3kDa del tiempo 0 y 120h. 66
- Figura 15. Electroferogramas para: a) SDS-PAGE Laemmli para las proteínas concentradas en la membrana de ultrafiltración con peso molecular mayor a 5 kDa y b) SDS-PAGE Tricina para proteínas y péptidos del permeado con peso molecular menor a 5 kDa para todos los tiempos de la fermentación. 68
- Figura 16. Electroferogramas de hidrolizados proteicos obtenidos por FAL usando papaya y melaza como fuente de carbono. Standard: marcador de masa molecular, 0, 24, 48, 72, 96 y 120. a) Laemmli SDS- PAGE b) SDS-PAGE tricina. 69
- Figura 17. Pasteurización de muestras que fueron sometidas a tratamiento térmico a 60°C por 30 min. 71
- Figura 18. Concentración de aminoácidos en la fermentación láctica de desperdicios de atún con papaya y melaza como fuente de carbono. 75
- Figura 19. Separación de fracciones proteicas mediante cromatografía de exclusión molecular con Biogel P4 de t=72h de la FAL con el electroferograma de los péptidos encontrados en las fracciones. 77
- Figura 20. Separación de la fracción 3 mostrada en la figura 19 mediante cromatografía de filtración en gel Sepharose DEAE FF con interacción aniónica débil, determinación de la AAR y electroferograma de las fracciones. 78
- Figura 21. Estructura tridimensional del radical DPPH. 81

- Figura 22. Separación de fracciones proteicas mediante cromatografía de exclusión molecular con Sephacryl S-100 de t=0h de la FAL, con el tiempo de retención, el porcentaje de AAR y el peso molecular de acuerdo con el estándar. 84
- Figura 23. Separación de fracciones proteicas mediante cromatografía de exclusión molecular con Sephacryl S-100 de t=72h de la FAL, con el tiempo de retención, el porcentaje de AAR y el peso molecular de acuerdo con el estándar. 85
- Figura 24. Separación de fracciones proteicas mediante HPLC de fase reversa de la fracción 10 de t=72h de la FAL. 86

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Máxima capacidad amortiguadora	29
Ecuación 2. Modelo de Gompertz.....	30
Ecuación 3. Grado de hidrólisis.	32
Ecuación 4. Digestibilidad proteica.	33
Ecuación 5. Porcentaje de actividad antirradicalaria por el método espectrofotométrico.....	35
Ecuación 6. Porcentaje de actividad antirradicalaria por RPE.....	36

Abreviaturas

Abreviaturas utilizadas en el texto

<i>AL</i>	Ácido láctico
<i>AR</i>	Actividad antirradicalaria, expresada como porcentaje
<i>BAL</i>	Bacterias ácido lácticas
<i>CHA</i>	Cabezas, huesos y aletas de <i>Thunnus albacares</i>
<i>CO</i>	Carne oscura cocida de <i>Thunnus albacares</i>
<i>DEAE</i>	Dietilaminoetil, grupo funcional en agarosa de cromatografía preparativa
<i>DP</i>	Digestibilidad proteica, expresada como porcentaje
<i>DPPH</i>	2,2-difenil-1-picrilhidracil. Radical libre estable.
<i>EMB</i>	Eosina azul de metileno, medio de cultivo
<i>EPR, RPE</i>	Resonancia paramagnética electrónica
<i>FAL</i>	Fermentación ácido láctica
<i>GH</i>	Grado de hidrólisis, expresado como porcentaje
<i>HPLC</i>	Cromatografía de líquidos de alta resolución
<i>HPP</i>	Hidrolizados de proteínas de pescado
<i>MRS</i>	Man Rogosa Sharpe, medio de cultivo
<i>RVB</i>	Rojo violeta bilis, medio de cultivo
<i>SDS-PAGE</i>	Electroforesis de gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio como agente desnaturizante
<i>TFA</i>	Ácido trifluoroacético
<i>V</i>	Vísceras frescas de <i>Thunnus albacares</i>

Resumen

Los residuos de la industria procesadora de pescado son materia prima con un gran potencial para la producción de hidrolizados de proteínas de pescado (HPP) con características funcionales que pueden ser utilizados no sólo como alimento para animales, sino también para el consumo humano (es decir, los aditivos alimentarios y nutracéuticos), que incluye la búsqueda de péptidos biológicamente activos. La hidrólisis se lleva a cabo con microorganismos (fermentación). La fermentación se ve beneficiada al añadir un promotor, en este caso papaya (*Carica papaya*) en estado de madurez comercial, que produce proteasas y suplementa a los desechos de pescado con los nutrientes adecuados para el crecimiento microbiano, así como melaza que es un subproducto de la caña de azúcar. El procesamiento industrial de especies de pescado como el atún genera un porcentaje de subproductos entre el 60 y 70%. Los subproductos son considerados comúnmente como recursos de escaso valor en el mercado y entre ellos se encuentran las vísceras, las agallas, el músculo oscuro, la cabeza, los huesos y la piel.

El alto contenido de proteína, las enzimas proteolíticas y la capacidad amortiguadora del sustrato fueron características importantes para tener una producción satisfactoria de hidrolizados proteicos obtenidos a partir de fermentación láctica.

Se determinó el consumo de azúcares, los cuales se relacionan directamente con la producción de ácido láctico (AL). La concentración máxima de AL generado, la constante de la tasa de acidificación y la tasa de máxima producción de ácido láctico se estimaron con el modelo de Gompertz con datos de 5 días (120h) de fermentación y éstos fueron de 1.27 mmol AL/g, 0.142 h⁻¹ y 0.067 mmol AL/gh, respectivamente. El grado más alto de hidrólisis proteica fue de 87.71% y fue alcanzado a las 120 h de fermentación.

Resumen y abstract

La actividad contra radicales libres fue evaluada mediante espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) basándose en la conversión del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil. La concentración de aminoácidos relacionados con la actividad antirradicalaria (Val, Ile, Leu, Phe, Met, Pro, Tyr and His) presentó un máximo a partir de las 72 h debido al incremento de la hidrólisis proteica. En este tiempo de fermentación se obtuvo la concentración más baja de hidrolizados proteicos capaces de inhibir al radical en un 50% de su actividad, a cual fue de 5.75 µg proteína/mg.

La purificación de péptidos mostró fracciones con una alta concentración de aminoácidos hidrofóbicos, que están relacionados con la actividad contra radicales libres

El procesamiento de subproductos de atún mediante la metodología propuesta resulta ser una fuente de hidrolizados proteicos de alto valor agregado debido a su actividad contra radicales libres, la estabilidad del proceso, el alto grado de hidrólisis y digestibilidad, así como la inocuidad al no encontrarse la presencia de coliformes.

Palabras clave: *Thunnus albacares*, antioxidante, biorefinación, hidrolizado proteico, *Carica papaya*

Abstract

Fishery industry by-products are raw material with a wide potential to produce fish protein hydrolysates with functional properties that may lead their use not only for animal nourishment but for human consumption (i.e. food additives and nutraceuticals), which includes the search of biologically active peptides. Hydrolysis is carried by microbial fermentation, which gets benefit when it is promoted by the addition of papaya fruit (*Carica papaya*) in commercial ripeness as a source of proteases and nutrients for microbial growth, as well molasses as a carbon source (by-product of the sugar cane industry).

Industrial processing of fish species like tuna generate a by-product percentage between 60 and 70%, are considered a low value material and consist mainly in viscera, gills, dark muscle, heads, bones and skin.

High protein content, proteolytic enzymes and substrate buffer capacity were important characteristics for successful production of protein hydrolysates by fermentation of tuna by-products and papaya. The maximum lactic acid (LA) produced, acidification rate constant and maximum acid production rate were estimated by Gompertz model with experimental data of 5 d of fermentation to be 1.27 mmol LA/g, 0.142 h⁻¹ and 0.067 mmol LA/gh, respectively. The highest protein degree of hydrolysis of 87.71% was achieved at 120 h of fermentation. The radical-scavenging activity in the protein hydrolysates was determined by electron paramagnetic resonance spectroscopy studies based on the conversion of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil free-radical. The concentration of amino acids related to radical-scavenging activity; Val, Ile, Leu, Phe, Met, Pro, Tyr and His presented a maximum after 72 h of fermentation, due to increased protein hydrolysis. In addition, the lowest concentration of tuna protein hydrolysates, 5.75 µg protein/mg, this inhibited 50% of radical activity.

Purification of peptides shows a high concentration of hydrophobic amino acids, which are related to radical scavenging activity.

This process, which involves tuna by-products fermentation according to the method proposed, results to be a source of high quality protein hydrolysates because of the radical scavenging activity, process stability, high degree of hydrolysis and digestibility, as well safety due to the lack of presence of coliform bacteria.

Key words: *Thunnus albacares*, antioxidant, radical scavenging, biorefinery, protein hydrolysate, *Carica papaya*

1. Revisión bibliográfica

1.1 Residuos de la actividad pesquera y agrícola

Como resultado de la pesca comercial y de las actividades de acuicultura, se generan diversos productos derivados de procesamiento y fileteado en la industria pesquera, así como la presencia de especies de peces sin valor comercial. En caso de la pesca, se generan desechos (por ejemplo: la piel, huesos, recortes, cuadros, cabezas, vísceras y aletas), que generalmente son desechados. Las industrias que procesan productos marinos convierten y utilizan estos desechos o subproductos como productos de alto valor agregado como el aceite de pescado, harina de pescado, fertilizantes, alimentos para mascotas y ensilado de pescado, cuya producción se ha encarecido y se ha convertido en una materia prima costosa. (Ramírez-Ramírez y *col.* 2008). Los residuos de la industria pesquera, así como los de la pesca por captura causan graves problemas ambientales en muchas partes del mundo, ya que se eliminan de forma inadecuada. Sin embargo, los residuos son valiosos como fuente de compuestos de alto valor agregado.

Los residuos de la industria procesadora de pescado son materia prima con un gran potencial para la producción de hidrolizados de proteínas de pescado (HPP) con características funcionales que pueden ser utilizadas no sólo como alimento para animales, sino también para el consumo humano (es decir, los aditivos alimentarios y nutracéuticos), que incluye la búsqueda de péptidos biológicamente activos. Durante el proceso de producción de HPP, la hidrólisis de las proteínas de alto peso molecular se produce por la ruptura de enlaces peptídicos por medio de la adición de agua (Bárzana y García, 1994) en conjunto con la ayuda de los ácidos, álcalis o medios biológicos como la adición de enzimas o microorganismos (fermentación). La fermentación se ve beneficiada al añadir un promotor, que produce proteasas y suplementa a los desechos de pescado

Revisión bibliográfica

con los nutrientes adecuados para el crecimiento microbiano (Venugopal, 1994; Shirai y Ramírez-Ramírez-2010).

El atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) es una especie pelágica de gran importancia comercial. Comparte ciertas características anatómicas y fisiológicas con las demás especies de túnidos para poder realizar migraciones distantes en el océano, las cuales se pueden resumir en tres. La primera es la eficiencia en el nado, favorecido por la forma del cuerpo y de la aleta caudal, protuberancias en la cola que evitan la cavitación, la posición de los músculos y el músculo oscuro que compensa el movimiento de los demás músculos evitando el desplazamiento lateral y aumentando la frecuencia del movimiento de la cola, reduciendo la resistencia al avance. La segunda es la capacidad de poder conservar la temperatura corporal de manera parcial por el sistema vascular que se conecta con el músculo oscuro (endotermia regional) y la posición que evita conducir el calor hacia el exterior, para que el metabolismo se vea favorecido al conservar el calor en las vísceras. La tercera consiste en soportar condiciones en las que el oxígeno disuelto en el agua es bajo debido a la profundidad del nado al tener una concentración de hemoglobina, mioglobina y hematocritos más alta que en otros peces, todo esto para poder alimentarse lo más distante posible de la superficie (Graham y Dickinson, 2004). El músculo oscuro cumple una función muy útil para el atún, sin embargo al ser pescado y procesado, la cocción lo convierte en una carne oscura con un color, olor y sabor muy diferente al del músculo claro del lomo, se puede apreciar en la Figura 1. Esquema transversal de la anatomía del atún (*Thunnus albacares*), mostrando algunos de los productos y subproductos del procesamiento (Huda Herpandi y col, 2011). cómo es que la posición de ambos difiere en un corte transversal del atún crudo. Dichas características le restan importancia comercial y es considerado como subproducto del proceso.

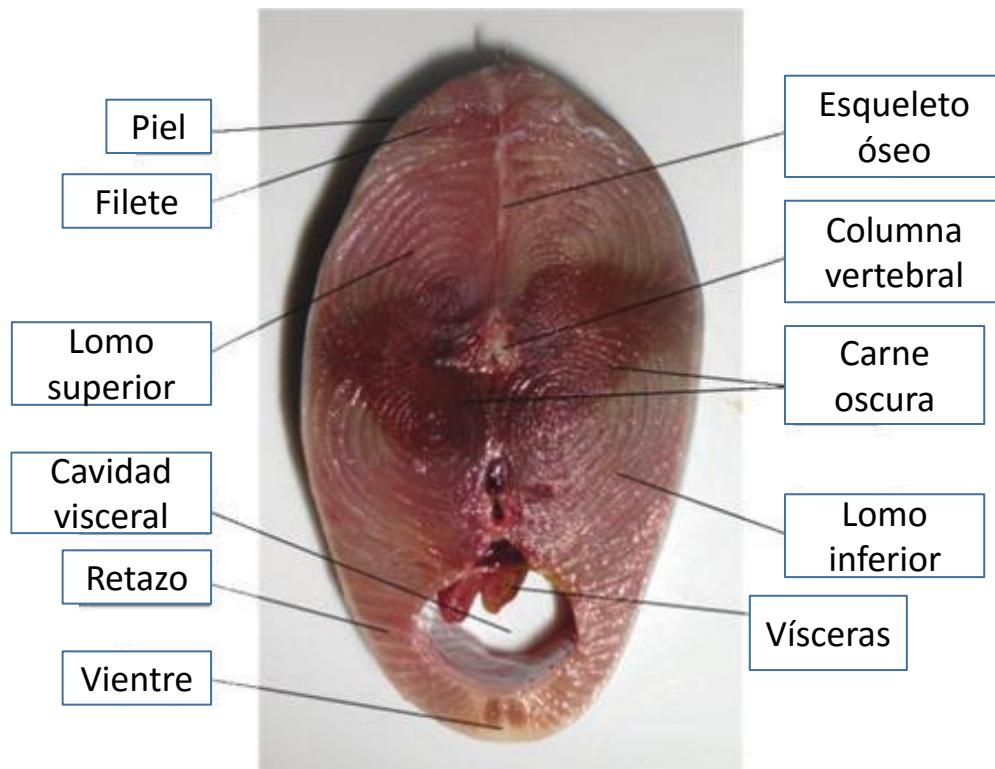


Figura 1. Esquema transversal de la anatomía del atún (*Thunnus albacares*), mostrando algunos de los productos y subproductos del procesamiento (Huda Herpandi y col, 2011).

Cuando se habla de subproductos marinos, se refiere a la materia prima apta para el consumo pero susceptible a la descomposición si no se procesa inmediatamente después de obtenerse, usualmente con bajo valor comercial como son las vísceras, cabezas, retazos, huesos, piel y fauna de acompañamiento. Los subproductos del fileteado del pescado usualmente se han utilizado para la productos a granel, algunos de bajo valor agregado como el ensilado, harina de pescado, aceite, fertilizante y comida de mascotas, lo cual resulta en bajas ganancias para la industria pesquera (Rustad, y col. 2011). El atún es un producto pesquero muy importante para México, de acuerdo con la comisión nacional de pesca y acuicultura, reporta que todas las especies de túnidos son el segundo producto más importante de la producción pesquera del país, justo

Revisión bibliográfica

después del camarón. En el 2013 la producción creció en un 20% comparada con el año anterior, siendo de 149,475 toneladas de peso vivo.

Desde hace siglos, la fermentación del pescado ha sido una alternativa para llevar estos productos a los consumidores lejanos a las costas, debido a que resultaba imposible transportarlos frescos el tiempo que duraba el viaje. Los más comunes son el pescado salado, la salsa de pescado y la pasta de pescado. La salsa de pescado es un líquido café claro con un sabor salado y ligero sabor a pescado que es consumido como condimento en Europa y en el sureste de Asia.

El método convencional para producir salsa de pescado en Tailandia, Indonesia, Corea y otros países de Asia consiste en almacenar peces pequeños salados (por ejemplo anchovetas) en tanques subterráneos de concreto o vasijas de barro por un periodo de 9 a 12 meses para completar la hidrólisis. Estos métodos tradicionales para la preparación de hidrolizados se basan en la autólisis, que es el uso de las enzimas endógenas y es bastante difícil de controlar debido a varios factores, incluyendo especies de peces y estacionales, así como el tipo y la cantidad de enzima (Šližyte y col. 2005; Bhaskar y col. 2008). Otro método para fermentar pescado es mediante la fermentación ácido láctica (FAL), la cual tiene la ventaja de acortar el proceso. La gran ventaja de trabajar con ensilado de pescado es un valor nutritivo alto y el hecho de que se puede utilizar como un ingrediente de la dieta animal en varias especies. Generalmente la eficiencia de la FAL se basa en la tasa de disminución de pH y de su valor final, el cual depende de la actividad de agua, temperatura y tiempo de proceso, actividad del inóculo y capacidad amortiguadora. En este sentido, el aprovechamiento de subproductos de pescado requiere información respecto a la capacidad amortiguadora, actividad proteasa endógena, así como el contenido de ceniza y proteína. Una manera de favorecer la proteólisis es mediante la adición de enzimas externas, una fuente de ellas son algunos frutos que contienen endopeptidasas de cisteína como la papaya (*Carica papaya*; papaína: EC 3.4.22.2 y actinidaína: EC 3.4.22.14), la piña (*Ananas comosus*; bromelaína: EC 3.4.22.33 y actinidaína), el kiwi (*Actinidia spp.*; actinidaína), la raíz de jengibre

(*Zingiber officinale*; zingibaína: EC 3.4.22.67) y los higos (*Ficus carica*; ficaína: EC 3.4.22.3). Debido a que las fuentes de nutrientes para BAL cubren un espectro amplio de sustratos, este trabajo tiene la intención de utilizar *Carica papaya* para aprovechar las enzimas proteolíticas estables que contiene y azúcares contenidos. Además, es un fruto que se cultiva masivamente durante todo el año en países tropicales debido a su alta demanda como fruta fresca y como ingrediente en el procesamiento de alimentos (Fabi y col. 2007). Su amplia producción en México se centra en los estados de Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Colima y Michoacán, con una producción anual total de 707,346.52 toneladas en 2009 (CVCA, 2010). Su producción se designa a los consumidores finales en los mercados locales e internacionales que piden altas calidades, con sujeción a un precio estable en los mercados internacionales y amplias variaciones de precios en los locales. El destino de los productos de alta calidad es la exportación, el de los de menor calidad, que son mucho más abundantes, es local. El uso industrial incipiente se limita sólo a la elaboración de alimentos y la extracción de la papaína intermitente, que conduce a la subutilización de la producción de papaya, cuando se supera, dejando que los comerciantes intermediarios que adquieren con pocos beneficios a los productores (Snitt, 2003). Con una nueva alternativa en el uso de la papaya, el mercado local mejorará la estabilidad y el desarrollo industrial, el ahorro de recursos posteriores a la cosecha y el transporte, si los ensilajes de pescado se realizan en lugares cercanos a las regiones de producción de papaya.

1.2 El radical estable DPPH

El DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) es un radical que se empezó a usar hace más de 50 años para cuantificar antioxidantes fenólicos. Actualmente su uso se ha extendido ampliamente para determinar actividad contra radicales libres debido a la sencillez del método. Es un radical libre estable que persiste por horas en una solución, mientras que los radicales más activos en materiales reales como hidroxilo (HO^{\bullet}), anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), óxido nítrico (NO^{\bullet}), peroxil de lípidos (LOO^{\bullet})

y alcoxil (LO[•]) tienen una vida en el orden de los milisegundos a los segundos, por lo que los compuestos que se deben evaluar deben ser rápidos para neutralizar al radical.

El DPPH puede ser neutralizado tanto por transferencia de átomos de hidrógeno como por transferencia de electrón en al menos cuatro secuencias diferentes. El solvente y el pH, en particular, influyen de manera importante el mecanismo dominante y pueden diferenciar compuestos actuando por un mecanismo específico o por ambos. Por ejemplo, los solventes de enlace de hidrógeno reprimen la transferencia de hidrógeno y favorecen la transferencia de electrones, por lo que los compuestos que son muy activos en la transferencia de átomo de hidrógeno parecen ser lentos cuando reaccionan con metanol y etanol, usados comúnmente en este ensayo.

De manera similar, la actividad de compuestos que neutralizan principalmente por transferencia de electrones es fuertemente dependiente del pH, siendo lento en ácido y se va incrementando con el pH en la medida que se permite la ionización del grupo fenólico. La reactividad aparente de los compuestos con la capacidad de neutralizar mediante mecanismos compuestos puede cambiar de manera sustancial con las condiciones de reacción (Xie y Schaich, 2014).

1.3 Péptidos con actividad antihipertensiva

Un compuesto bioactivo es cualquier sustancia alimenticia que, más allá de su valor nutricional, tiene actividad biológica específica en un nivel fisiológicamente realista, influyendo en la salud de manera benéfica. Los compuestos bioactivos pueden presentarse naturalmente en los alimentos o pueden ser añadidos a otros que normalmente no los poseen. Estos alimentos son considerados como funcionales. (Marques y col. 2012)

Estudios recientes han reportado una buena cantidad de péptidos bioactivos a partir de diversas especies de peces. Poseen secuencias cortas que oscilan entre los 2 y 20 aminoácidos.

Revisión bibliográfica

Estos péptidos son producidos mediante hidrólisis proteolítica usando enzimas comerciales como la tripsina, quimotripsina y alcalasa; mediante microorganismos proteolíticos y mediante fermentación. Después de la digestión, los péptidos son absorbidos en el intestino y entran en el torrente sanguíneo directamente, lo que asegura su biodisponibilidad *in vivo* y el efecto fisiológico en el sitio de destino. La efectividad de un alimento funcional basado en péptidos con actividad biológica depende de la capacidad de preservar la biodisponibilidad de los ingredientes activos. Hay investigaciones que demuestran que las proteínas no se absorben con la misma facilidad que tienen los péptidos de dos a seis aminoácidos (Grimble y col. 1986). Una causa de este tipo de limitaciones es la escasa permeabilidad a través de membranas biológicas debido al peso molecular. Se ha demostrado que los péptidos contenidos en los microorganismos marinos tienen un amplio espectro de efectos, ya sea antihipertensivo, inmunomodulador, antitrombótico, antioxidante, anticáncer y antimicrobiano. Se han aislado diversos compuestos bioactivos a partir de proteínas de músculo de pez, de colágeno y gelatina, de aceite, huesos y vísceras (Senevirathne y Kim, 2012).

Los péptidos con actividad biológica específica se localizan en la secuencia de aminoácidos de una proteína dada. La degradación enzimática de la comida en los intestinos y en el procesamiento de alimentos libera secuencias de péptidos de cadena corta de proteínas intactas, glicoproteínas y lipoproteínas. En algunos casos los péptidos pueden actuar como compuestos reguladores con una actividad similar a la de las hormonas, basándose en su composición de aminoácidos y secuencia. Los péptidos bioactivos contienen usualmente de 3 a 20 residuos de aminoácidos por molécula. Existen fuentes tanto animales como vegetales. Los péptidos deben cruzar el epitelio intestinal y entrar a la circulación sanguínea o unirse directamente a receptores epiteliales de la superficie de la célula de manera que se alcance una respuesta biológica (Pihlanto y Korhonen, 2003).

Se han reportado péptidos bioactivos mediante hidrólisis enzimática a partir de caseína (Pihlanto y Korhonen, 2003), de gelatina de calamar (Alemán y col. 2011), germen de trigo (Matsui

Revisión bibliográfica

y col. 1999), soya (Wu y Ding, 2001), músculo de sardina (Matsufuji y col. 1994) entre otros. Se han reportado péptidos obtenidos mediante autólisis de intestinos de bonito (*Katsuwonus pelamis*) (Matsumura y col. 1993) y de ajo (*Allium sativum*) mediante extracción acuosa (Suetsuna, 1998). La hidrofobicidad en el amino terminal es una característica común de algunos péptidos con actividad biológica (Kim y col. 2012)

2. Justificación

El procesamiento industrial de especies de pescado como el atún, bacalao y trucha generan un porcentaje de subproductos entre el 60 y 70% (Chen y Jaczynski, 2007). Los subproductos de atún son vistos comúnmente como recursos de escaso valor en el mercado. Los residuos sólidos generados por las industrias procesadoras están compuestas de músculo (después de retirar el lomo), vísceras, agallas, carne o músculo oscuro, cabeza, huesos y piel (Huda Herpandi y col. 2011). Los altos niveles de subproductos se van a incrementar con el tiempo debido al aumento en la producción de productos pesqueros en respuesta a la demanda creciente de los mercados. Bajo estas circunstancias, el procesamiento de atún es un área prometedora en la que los subproductos pueden alcanzar valor agregado si se procesan por medios biotecnológicos para evitar también el impacto ambiental.

Existen nutraceuticos, los cuales son compuestos bioactivos aislados o purificados a partir de alimentos que normalmente se comercializan en formas farmacéuticas o que son agregados a los alimentos procesados, volviéndolos alimentos funcionales. Los compuestos bioactivos son cualquier sustancia de origen alimenticio (esencial o no esencial) que aparte de poseer un valor nutricional tienen una actividad biológica a un nivel fisiológico realista, beneficiando a la salud (Marques y col. 2012).

Japón es el único país que ha establecido en su legislación una categoría específica para estos alimentos, conocidos como Alimentos para usos específicos en la salud.

Revisión bibliográfica

Si se toma en cuenta que los compuestos bioactivos no sólo se encuentran en los alimentos sino también en los subproductos derivados de su procesamiento, que resultan en muchos casos un desperdicio causante de contaminación ambiental, el procesamiento de dichos materiales da como resultado productos de alto valor agregado que contribuyen a combatir enfermedades crónico-degenerativas. Con los avances científicos derivados del estudio de compuestos bioactivos se han creado antecedentes para que las naciones puedan aprovechar sus recursos para obtenerlos. La importancia del estudio realizado en este proyecto de tesis es la contribución al reconocimiento de la actividad biológica benéfica de compuestos derivados de subproductos pesqueros y agrícolas de origen nacional, para que junto con otras investigaciones realizadas por otros científicos se pueda crear un antecedente en este país y que sea reconocida su relevancia en la legislación, como en el caso de Japón. Bajo esta perspectiva, la producción de péptidos bioactivos a partir de desperdicios de atún mediante FAL con papaya y melaza como fuente de carbono no se ha reportado.

A pesar de que existen otros métodos para el procesamiento de subproductos pesqueros, como el caso de enzimas proteolíticas comerciales, los materiales que se proponen en el trabajo se producen en localidades del país con actividades pesqueras y agrícolas, con ventajas no sólo por la cercanía a los litorales sino por el clima tropical. Utilizar materias primas locales disminuye los costos y transporte por largas distancias y en el caso de las proteasas comerciales, si se considera su ciclo de vida, se ahorran los recursos que se requieren para producir y purificar enzimas microbianas, así como su transporte.

3. Objetivo general

Estudio del aprovechamiento de desperdicios de productos pesqueros y agrícolas para la obtención y caracterización de hidrolizados proteicos con actividad biológica

4. Objetivos particulares

- Establecimiento de condiciones para la fermentación de acuerdo con las características de los desperdicios de atún (*Thunnus albacares*), de Papaya (*Carica papaya*) y melaza del procesamiento de caña como fuente de carbono, así como del cultivo bacteriano iniciador
- Caracterización químico biológica de hidrolizados proteicos a partir de fermentaciones ácido lácticas de desperdicios de atún con papaya y melaza con el objetivo de determinar la estabilidad del proceso y de los productos obtenidos.
- Selección de fracciones de hidrolizados proteicos con base en sus actividades antioxidante y antihipertensiva.

5. Hipótesis

La fermentación ácido láctica de subproductos de atún y papaya es una fuente de hidrolizados proteicos con actividad biológica.

6. Materiales y métodos

6.1 Desperdicios de la industria pesquera

Los desperdicios de atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) se obtuvieron de una planta procesadora de atún enlatado en Mazatlán, Sinaloa (México). Los desperdicios consistieron en tres fracciones: vísceras frescas (V), cabezas, huesos y aletas (CHA) y carne oscura (CO). El pescado fue eviscerado manualmente y la cavidad abdominal lavada con agua, posteriormente fue cocido con vapor a 100°C por 3 horas. La CO y las CHA fueron separadas del pescado. Cada fracción fue molida por separado a través de una malla de 5 mm usando un molino de carne (Torrey 32-3, Mexico) y almacenada a -20°C.

6.2 Fuente de carbono

La melaza de caña fue proporcionada por el ingenio “El Molino, S.A. de C.V.” ubicado en el estado de Nayarit (Mexico). La papaya (*Carica papaya* var. Maradol) se utilizó en estado de madurez comercial (cáscara amarillenta y pulpa suave color naranja); fue sanitizada y procesada en una licuadora antes de utilizarse. Los azúcares solubles en la melaza y en la papaya fueron determinados por el método de fenol-ácido sulfúrico. (Dubois y col., 1956).

6.3 Determinación de las proporciones de desperdicios de atún en la mezcla para la FAL

La proporción de los desperdicios de atún varió en la concentración de V y CHA (%p/p): 64.9:7.2; 43.8:28.3; 33.3:39.3; 14.4:42.3; 7.2: 64.9. La proporción de CO se mantuvo fija a 27.9 %p/p, considerando que esta fracción presentaba el contenido de proteína más alto. Las mezclas se analizaron para determinar actividad proteasa neutra (Kunitz, 1947) y contenido de cenizas (AOAC, 1997). Se tomaron 5 g de cada una de las muestras de atún y se homogeneizaron en 50 ml de agua desionizada. Las mezclas se equilibraron a 25°C y se titularon con agitación continua con ácido láctico 0.054 N empleando un potenciómetro con electrodo de vidrio (pH 210 HANNA, Italia). La

máxima capacidad amortiguadora (β_{\max}) se estimó considerando la pendiente de las curvas de neutralización en la vecindad inmediata al valor de pKa (pKa del AL=3.86) De acuerdo a la siguiente ecuación (Baicu y Taylor, 2002).

$$\frac{dV}{dpH} = \beta_{\max} = \left| \frac{a}{4b} \right| = \left| \frac{(y_2 - y_1)}{(x_2 - x_1)} \right|$$

Ecuación 1. Máxima capacidad amortiguadora

dV está expresada en mmol/l, β_{\max} en slykes (mmol de AL requeridos para titular el pH de 1 g (peso húmedo) de atún por unidad de pH). La primera derivada $f'(X_0) = \left| \frac{a}{4b} \right|$ es la pendiente de la tangente de la curva de titulación a un pKa dado. Los límites de la linealidad son $(y_2 - y_1)$ y $(x_2 - x_1)$ de la curva de pH-volumen de AL. La tangente y la porción lineal de la curva se superpusieron y sus respectivas pendientes coinciden.

6.4 Determinación de cantidad de cultivo iniciador

Se utilizó la bacteria *Lactobacillus plantarum* (APG-Eurozyme), la cual fue propagada en agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) a 30 °C y mantenida a 8 °C previo a su uso. El inóculo se preparó en caldo MRS mediante la deposición de colonias bacterianas e incubadas a 30 °C por 24 horas para alcanzar una cuenta de 10^8 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

La cantidad de cultivo iniciador se determinó utilizando 10% de melaza de azúcar de caña para la mezcla de desperdicios de atún seleccionada e inoculada con 5, 10 o 20% (%v/p base seca) de *L. plantarum* a 30°C. Se aplicó el modelo integrado de Gompertz para analizar los datos cinéticos de la producción de AL en función del tiempo de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$P = P_{\max} \exp(-b \exp(-kt))$$

Ecuación 2. Modelo de Gompertz

Donde P_{\max} es el máximo AL producido ($t \rightarrow \infty$), b es una constante relacionada con las condiciones iniciales (cuando $t=0$, entonces $P = P_{\max} \exp(-b)$) y k es la constante de la tasa de acidificación. Las constantes cinéticas P_{\max} , b y k se estimaron mediante regresión no lineal con el programa STATISTICA ® (StatSoft, Inc.). La tasa máxima de producción de (V_{\max}) se calculó a partir de los parámetros del modelo de Gompertz como $V_{\max}=0.368 kP_{\max}$.

6.5 Determinación de concentraciones de papaya como fuente de carbono para las bacterias lácticas

Los desperdicios de atún se mezclaron en las siguientes proporciones: 27.4, 33.3 and 39.3% (p/p) de carne negra, vísceras y huesos, cabezas y aletas, respectivamente para el proceso de fermentación. Se agregó a los desperdicios de atún 5% (v/p) de inóculo, 10% de melazas de caña de azúcar y diversas concentraciones de papaya 10, 20, 30 o 50% (p/p). Las muestras fueron contenidas en frascos e incubadas a 30°C. Las muestras fueron extraídas cada 24 horas hasta las 192h.

6.6 Fermentaciones en un reactor de columna de lecho empacado

La FAL se llevó a cabo en un reactor de columna de acero inoxidable colocado en una cámara de temperatura controlada y llenado con 4 kg de desperdicios de atún, 5 % (p/p) de inóculo, 10% (p/p) de melaza y 30% (p/p) de papaya. Después de mezclarse, las muestras (200g) se tomaron del reactor al inicio y posteriormente cada 24 h hasta las 120 h para su análisis. Las muestras de la FAL se mezclaron en una dilución 1:10 con agua desionizada, homogeneizada a 3200 rpm por 2 min en un homogeneizador Ultraturax ® T 25 (IKA, Alemania) y centrifugado por 10 min a

15,000 g (4 °C). El pellet se descartó y el sobrenadante fue pasado a través de un filtro de celulosa con poros 22 µm (Columbia Filter, Mexico).

6.7 Análisis microbiológico

Se prepararon diluciones decimales en una solución de NaCl 0.9 % (p/v) para determinar la cuenta de células viables en placas de agar con medio Man Rogosa Sharpe, eosina azul de metileno (EMB) y rojo violeta bilis (RVB) para BAL y enterobacterias, respectivamente.

6.8 Caracterización química de los hidrolizados proteicos

El pH de las muestras fue determinado con un potenciómetro con electrodo de vidrio (pH 210 HANNA, Italia). Las muestras se diluyeron en agua destilada (1:10) y la concentración de ácido láctico fue determinada por titulación con NaOH 0.1N hasta un pH final de 7.5 y expresado como mmol de ácido láctico/g (AOAC, 1997). Para la determinación de azúcares soluble totales y la determinación de proteína soluble, las muestras se diluyeron en una proporción 1:10 con agua destilada, homogeneizada y centrifugada a 10, 000 rpm y 4°C por 20 minutos (Beckman J2-M, Fullerton, EEUU). Los azúcares soluble totales se determinaron a partir de los sobrenadantes por el método del fenol sulfúrico (Dubois y *col.* 1956). De la misma manera, la determinación de proteína soluble se llevó a cabo por el método de Lowry Peterson (Peterson y *col.* 1983). Las mezclas se analizaron para determinar actividad proteasa ácida y neutra (Anson, 1938; Kunitz, 1947).

6.9 Determinación de azúcares y ácidos orgánicos contenidos en el ensilado mediante cromatografía de líquidos de alta resolución

El sobrenadante obtenido en el procedimiento anterior fue analizado mediante cromatografía de líquidos de alta resolución en un equipo Perkin Elmer ® 1020 LC plus de bomba binaria equipado con un detector de índice de refracción LC-30, con una columna empacada Biorad Aminex contenida en un horno para columna Eppendorf CH 30 a 40°C. La fase móvil consistió en una solución de 50mM H₂SO₄. Los azúcares y ácidos orgánicos que fueron determinados son:

glucosa, sacarosa, fructosa, ácido láctico y ácido acético mediante el uso de curvas patrón para cada una.

6.10 Determinación de α -aminoácidos y el grado de hidrólisis (GH)

EL contenido de α -aminoácidos se determinó por el método del ácido 2,4,6-trinitrobencenesulfónico (TNBS) (Ramírez-Ramírez y *col.* 2008) usando concentraciones conocidas de *L*-leucina y expresadas como mM de α -aminoácidos. El grado de hidrólisis porcentual se calculó usando la ecuación:

$$GH = \frac{[(NH_2)_{t_x} - (NH_2)_{t_0}]}{[(NH_2)_{HT} - (NH_2)_{t_0}]} \times 100$$

Ecuación 3. Grado de hidrólisis.

Donde: $(NH_2)_{t_x}$ es la cantidad de grupos α -amino terminales liberados en el tiempo de la fermentación t_x ; $(NH_2)_{t_0}$ es la cantidad de grupos α -amino terminales liberados en el tiempo de la fermentación t_0 ; $(NH_2)_{HT}$ es la cantidad de grupos α -amino terminales sin fermentar obtenidos a partir de hidrólisis ácida.

6.11 Determinación de digestibilidad proteica *in vitro*

Se determinó la digestibilidad *in vitro* de las proteínas de las muestras con pepsina y pancreatina utilizando un método modificado reportado por Ramirez-Ramirez y *col.*, (2008). La proteína digerida mediante pepsina y pancreatina fue reportada como el porcentaje de digestibilidad proteica (DP) usando la

$$DP = \frac{(\text{Nitrógeno soluble en TCA})}{(\text{Nitrógeno total en la muestra})} \times 100$$

$$DP = \frac{(\text{Nitrógeno soluble en TCA})}{(\text{Nitrógeno total en la muestra})} \times 100$$

Ecuación 4. Digestibilidad proteica.

6.12 Determinación cuantitativa de aminoácidos contenidos en la FAL

Después de la hidrólisis de la muestra con HCl 6N, se realizó el análisis de aminoácidos siguiendo el método reportado por Aguilar-Navarro (2005) y Millipore Corporation (2009), en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent 1100 (sistema isocrático de una sola columna) con una columna AccQ Tag Nova pack C18®, 4µm, 3.9 x 150 mm (Waters, EEUU.) y un detector de fluorescencia. Las condiciones cromatográficas fueron de longitudes de onda de 410 nm y 250 nm de emisión y de excitación respectivamente, temperatura de 37°C con un volumen de inyección de 5 µL. Todos los cromatogramas se evaluaron con el software ChemStation Plus® (Agilent, EEUU.).

6.13 Fraccionamiento de proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares en los hidrolizados proteicos

Las extracciones se realizaron con un sistema de soluciones amortiguadoras propuesto por Niamuy y col., (2008). Los ensilados en el tiempo inicial y final de la fermentación fueron diluidos en 10 volúmenes de amortiguador A (15.6mM de Na_2HPO_4 , y 3.5mM de KH_2PO_4 , pH7.5), homogeneizados a 3200 RPM por 2 minutos en un homogeneizador Ultraturax T 25 (IKA, Alemania). Posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 10,000 rpm a 4°C. El sobrenadante obtenido contuvo las fracciones sarcoplásmicas. El precipitado fue homogeneizado y centrifugado con el buffer A dos veces más descartando el sobrenadante y posteriormente el precipitado fue humedecido en 10 volúmenes de buffer B (0.45M de KCl, 15.6mM de Na_2HPO_4 , y 3.5mM de KH_2PO_4 , pH7.5) y homogeneizado a 3200 RPM por 2 minutos en un homogeneizador Ultraturax T 25 (IKA, Alemania). Posteriormente se centrifugó por 10 minutos a 10,000 RPM a 4°C. El sobrenadante obtenido contiene las fracciones miofibrilares.

6.14 Distribución de los pesos moleculares de los hidrolizados proteicos mediante electroforesis desnaturalizante de Tricina

Este método se basa en el protocolo reportado por Schägger (2006). Se utilizó una solución de acrilamida-bisacrilamida (49.5%T, 6%C) para la preparación de los geles. Las soluciones amortiguadoras, para teñir y desteñir se prepararon con reactivos de alta pureza para electroforesis y con agua desionizada con $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ de resistividad. El voltaje con el que se corrieron los geles fue de 30V desde el inicio de la corrida hasta que las muestras entraron al gel separador. Posteriormente el voltaje se elevó a 150V hasta que las muestras entraron al tercer gel. Del tercer gel al final de la corrida el voltaje se elevó a 250V. Los geles fueron fijados, posteriormente teñidos

con una solución de azul de coomasie G al 0.025% y desteñidos con una solución de ácido acético glacial al 10%.

6.15 Actividad antirradicalaria con el radical DPPH

Para llevar a cabo estas determinaciones, se consideró el planteamiento que realiza Sharma y Bhat (2009) respecto a la estandarización de condiciones para el montaje de la técnica.

6.15.1 Determinación espectrofotométrica

Se preparó una solución de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) 0.1mM (Sigma Aldrich, México) con una concentración 0.1mM en metanol grado analítico (J.T. Baker, México). Las muestras se prepararon con la alícuota necesaria para las concentraciones probadas de las fracciones sarcoplásmicas y miofibrilares del tiempo 0 y 120 h, así como de las muestras tomadas cada 24 horas del extracto crudo. Se agregó el agua desionizada necesaria para tener 2 ml. Posteriormente se agregaron 2 ml de la solución de DPPH preparada previamente. Los tubos se agitaron en un vortex por 10 s a velocidad baja y se incubaron en la oscuridad a 30°C por 30 min. Se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 517 nm.

Para determinar el porcentaje de actividad contra el radical libre DPPH por el método espectrofotométrico se utilizó la siguiente ecuación:

$$AR = \left[\frac{(A_b - A_m)}{(A_m)} \right] \times 100$$

Ecuación 5. Porcentaje de actividad antirradicalaria por el método espectrofotométrico

Donde:

A_b = absorbancia del blanco

A_m = absorbancia de la muestra

6.15.2 Determinación mediante resonancia paramagnética electrónica (RPE)

Las soluciones de hidrolizados proteicos se prepararon y la AAR se determinó con un espectrómetro de resonancia paramagnética electrónica Elexys Super X ® (Bruker, Alemania) según el siguiente procedimiento: se prepararon diferentes concentraciones de proteína (20-1000 µg proteína soluble/mg) en los que se agregaron 2 ml de solución de DPPH 0.1mM en metanol preparada en el momento.

Los tubos se agitaron en un vortex e incubados a 30°C por 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente la muestra se colocó en una celda plana de cuarzo para hacer determinaciones basándose en el promedio de 4 escaneos, una frecuencia de 100kHz de modulación del campo, 9.78 GHz de frecuencia de microondas y 5mW de potencia de microondas. La AAR fue calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$AAR = \left(\frac{1 - H_x}{H_0} \right) \times 100$$

Ecuación 6. Porcentaje de actividad antirradicalaria por RPE

donde H_x y H_0 son la altura del tercer pico del espectro de resonancia para muestras con y sin proteína, respectivamente. Las determinaciones de AAR se llevaron a cabo por triplicado. Los datos fueron ajustados al análisis estadístico Probit en el programa NCSS ® (NCSS LLC. USA). El valor de IC_{50} es la concentración de hidrolizados proteicos capaces de inhibir al 50% la actividad del radical DPPH (Bougatef y col. 2010).

6.16 Pasteurización de las muestras

Muestras de la FAL completa (0-120 h) de 50 g fueron sometidas a un tratamiento térmico en un baño de agua a 60°C por 30 minutos, posteriormente se determinó la AAR de las muestras.

6.17 Fraccionamiento y purificación de péptidos

Tomando en cuenta los resultados de RPE, Se tomó muestra de 72 horas de la FAL, se mezclaron en una dilución 1:10 con agua desionizada, homogeneizada a 3200 rpm por 2 min en un homogeneizador Ultraturrax ® T 25 (IKA,,Alemania) y centrifugado por 10 min a 15,000 g (4 °C). El pellet se descartó y el sobrenadante fue pasado a través de un filtro de celulosa con poros 22 µm (Columbia Filter, Mexico). Dicho sobrenadante fue pasado por una membrana hidrofílica de 0.45 µm en un sistema de filtración por vacío (Millipore, EEUU). Se liofilizó para su posterior análisis. La muestra se resuspendió con agua desionizada en una proporción de 10 mg/ml para inyectarlo en un loop de 5 µl de un sistema Äkta Purifier ® (GE Healthcare, Suecia). La columna preparativa utilizada fue una Sephacryl S-100 ® de 25/600 (GE Healthcare, Suecia). Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 0.05M con NaCl 0.15M. Flujo de 1.3 ml/min. Fracciones de 15µl. La muestra de interés fue concentrada en un cartucho Sep-Pack ® (Waters-Millipore, EEUU) para eliminar el exceso de sales e inyectada en un gel SDS-PAGE de tricina para su secuenciación. Las muestras fueron previamente reducidas con ditioneitol (DTT), alquiladas con iodoacetamida (obtenida con Sigma-Aldrich) y digerida “in gel” con tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin). Los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS bomba de nanoflujo EASY-nLC II ® (Thermo-Fisher Co. San Jose, CA, EEUU) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos ® (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). La calibración del espectrómetro fue realizado con una solución Calmix® (N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621, los cuales se utilizan para calibrar el equipo Thermo Scientific LTQ Velos con detector de trampa de iones y Orbitrap en el modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina se incluye para extender a menor rango de calibración de masas)

Materiales y Métodos

esto permite determinaciones con exactitudes menores a 5 ppm mg/L). En el sistema de cromatografía de líquidos se utilizó un sistema gradiente de 10-80% de solvente B (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) en 120 minutos utilizando una columna capilar hecha en casa (ID 0.75 μm y 10cm largo RP-C18) . El flujo del sistema LC fue de 300 nanolitros/minuto. Para la fragmentación de los péptidos se utilizó los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High energy Collision Dissociation) donde solamente los iones con carga 2+, 3+ y 4+ fueron seleccionados para los eventos de fragmentación. No fueron considerados los iones con cargas 1+, superiores a 5+ y de cargas indefinidas. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 400 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 300 segundos. Los datos espectrométricos fueron sometidos a la búsqueda contra la base de datos del NCBI nr a través del programa Protein Prospector, así como también fueron sometidos a la búsqueda restringida contra PDB de UniProt de Thunnus en el programa Proteome Discoverer1.4, esto con el fin de verificar si se obtendría concordancias significativas con secuencias proteicas conocidas.

Se tomaron muestras del tiempo de 0 y 72 horas de la FAL, se mezclaron en una dilución 1:10 con agua desionizada, homogeneizada a 3200 rpm por 2 min en un homogeneizador Ultraturrax ® T 25 (IKA, Alemania) y centrifugado por 10 min a 15,000 g (4 °C). El pellet se descartó y el sobrenadante fue pasado a través de un filtro de celulosa (Columbia Filter, Mexico). Dicho sobrenadante fue pasado por una membrana hidrofílica de 0.45 μm en un sistema de filtración por vacío (Millipore, EEUU). Se liofilizó para su posterior análisis. La muestra se

Materiales y Métodos

resuspendió con agua desionizada en una proporción de 10 mg/ml para inyectarlo en un loop de 5 ml de un sistema Äkta Purifier ® (GE Healthcare, Suecia).

La fracción con más AAR fue pasada por una columna Tricorn 10/300 empacada con una fase estacionaria Sepharose DEAE FF (GE Healthcare, Suecia), usando un buffer de acetatos pH 4 0.02M, con gradiente de NaCl 1M de 0 a 100%, con un flujo de 1 ml/ min, colectando fracciones de 15 ml.

La fracción de menor peso molecular fue inyectada en un cromatógrafo de líquidos con las siguientes condiciones: una columna fase reversa modelo Symmetry ® con fase estacionaria C-18 de 3.5µm (3.0 x 250 mm) (Waters-millipore, E.E.U.U.) a 25°C en un cromatógrafo acoplado a un detector espectrofotométrico UV/visible a una longitud de onda $\lambda=215\text{nm}$. La elución se llevó a cabo inyectando 100 µL de muestra con un flujo de 1ml/min por 60 minutos de agua y 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en la solución A y acetonitrilo con 0.1 de TFA, con un gradiente de 0-100% de B. Todas las fracciones fueron colectadas.

7 Resultados y Discusión

7.1 Proporción de fracciones de desperdicios de atún

En este trabajo se utilizaron tres tipos de desperdicios provenientes del atún, por sus características no se puede asegurar que los tres tengan el mismo contenido de proteína y cenizas. Se determinó el contenido de proteína, cenizas y actividad proteasa neutra, así como el efecto de la proporción de fracciones de desperdicios de atún en la capacidad amortiguadora de la FAL. La CO presentó el contenido de proteína más alto ($50.06 \pm 1.12\%$) seguido por V ($46.22 \pm 0.55\%$) y CHA ($27.82 \pm 0.52\%$). La CO es un tejido característico de los peces cuya función es hacer el nado más eficiente y contiene una concentración alta de mioglobina, la cual tiene capacidad amortiguadora y aumenta la capacidad de los animales marinos para sumergirse. Esto se logra al contrarrestar la acumulación de AL en los músculos durante las condiciones hipóxicas.

El contenido de cenizas aumentó a la par de la concentración de CHA (Figura 2. Criterios empleados para seleccionar las proporciones de carne oscura: vísceras: cabezas, huesos y aletas (CO : V : CHA) expresados como máxima capacidad amortiguadora (β_{max}), actividad de proteasas y contenido de cenizas.), lo que provocó un incremento en la capacidad amortiguadora de las fracciones de pescado. La capacidad amortiguadora más alta fue estimada en la mezcla de 27.9:33.3:39.3 de CO:V:CHA, siendo de $84.24 \pm 2.96\%$ de slykes. Esta proporción de mezcla también contenía una cantidad alta de proteína, la cual contribuye a tener una capacidad amortiguadora alta.

Para poder tener una FAL estable se requiere una capacidad amortiguadora adecuada, ya que la acidificación acelerada puede inhibir al cultivo iniciador, así como influir en la actividad de las proteasas. Sin embargo, un sustrato con capacidad amortiguadora alta puede provocar que el pH no disminuya rápidamente y favorecer el crecimiento de microorganismos indeseables. Góngora y colaboradores (2012) reportaron que un cultivo iniciador de *Lactobacillus plantarum* fue capaz de

Resultados y Discusión

reducir el pH de un ensilado de pescado hasta un valor de 4, sin embargo, presentó inhibición después de 383 minutos a pH de 3 e inhibición a pH de 2. Cabe señalar que la CO y la mezcla de CHA, debido al proceso que se lleva a cabo en la industria que las proporcionó, estaban ya cocidas y que las vísceras sí se utilizaron crudas, por lo que la actividad de proteasas neutras se relaciona directamente con la proporción de este ingrediente en la mezcla. El nivel de enzimas endógenas en la mezcla con 33.3% p/p de V fue agrupado estadísticamente debajo de las proporciones de 43.8 y 64.9 % p/p, pero más alta que con las mezclas con proporciones de V de 7.21 y 14.42% p/p (Figura 2). Por lo tanto, basándose en la capacidad amortiguadora, en el contenido de proteína y en las proteasas neutras activas se seleccionó a la mezcla de 27.9% p/p CO, 33.3% p/p de V y 39.3% p/p de CHA para los experimentos posteriores.

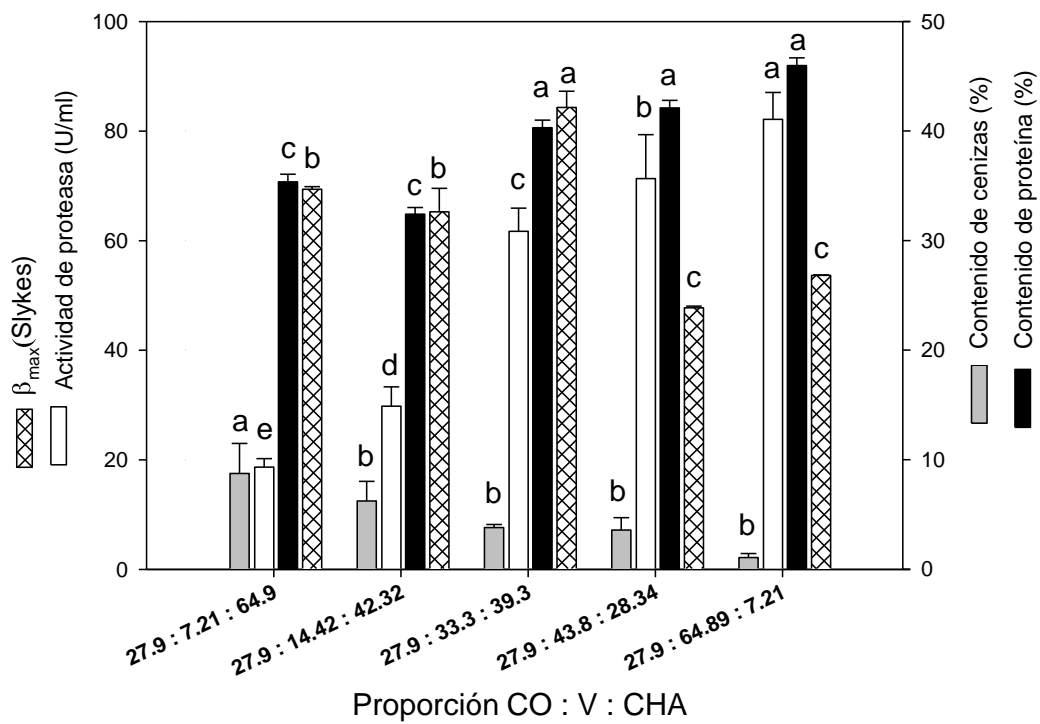


Figura 2. Criterios empleados para seleccionar las proporciones de carne oscura: vísceras: cabezas, huesos y aletas (CO : V : CHA) expresados como máxima capacidad amortiguadora (β_{max}), actividad de proteasas y contenido de cenizas.

7.2 Efecto de la concentración de la papaya en la acidificación en la fermentación ácido láctica (FAL)

Se puede pensar que en distintos estados de madurez de la papaya pueden ocurrir fluctuaciones en la concentración de azúcares, pero la madurez de la papaya no sería un problema cuando se lleve a cabo un escalamiento, ya que el contenido promedio de azúcares en una papaya madura fue de 43.5 ± 0.39 mg azúcares/g, este valor fue determinado después del análisis de ocho muestras tomadas en marzo y diciembre de 2007, 2012 y 2014 sin haber diferencias significativas entre los lotes, lo que concuerda con el estudio de Gómez y col. (2002) que determinó que no existían diferencias significativas entre los azúcares solubles totales de la papaya verde (38.6 mg azúcares/g), intermedia (43.8 mg azúcares/g) y madura (48.6 mg azúcares/g). Por lo tanto, las frutas descartadas comercialmente debido a percepciones sensoriales o a bajos estándares de calidad sí podrían usarse para esta FAL. Por otra parte, la concentración de papaya y el tiempo de la fermentación tienen un efecto significativo en la FAL.

En este estudio se determinó el efecto de la concentración de papaya como fuente de carbono en la FAL, los niveles probados fueron 10, 20, 30 y 50 % de papaya. Contrariamente a lo esperado, se obtuvieron valores bajos de pH (<5.0) y altos de ATT (>0.6 mmol de AL/g FAL) al incrementar la concentración de papaya (Figura 3. Determinación de pH y ATT de FAL con 5% de *Lactobacillus plantarum* como cultivo iniciador y con concentraciones de papaya). La disminución de la concentración de fruta implica el agotamiento del azúcar como fuente de carbono que induce un cambio de pH cercano a la neutralidad, con el riesgo del crecimiento de microorganismos indeseables. . El tratamiento con 50% de papaya mostró una ligera disminución de pH y valores altos de ATT aunque después de 96 h disminuyeron significativamente.

El tratamiento con 30% de papaya sin inocular presentó valores de pH cercanos a 5.5 de las 24 a las 168 horas. Sin embargo, se alcanzó la neutralidad al final de la fermentación. Como se

Resultados y Discusión

muestra en la figura 3, el tratamiento con melaza añadida mantuvo el pH cerca de 4.6 con un incremento en la ATT (>0.3 mmol AL./g FAL) como consecuencia del crecimiento de los lactobacilos. La presencia de éstos en la fermentación tiene la intención de inhibir a la microbiota que produce la putrefacción mediante la producción de ácido láctico, así como otros compuestos inhibidores como el peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Todorov y col. 2011). EL pH alcanzado no fue tan bajo (4.5) como en el trabajo de Ramírez-Ramírez y col. (2008) en su estudio de FAL con pescado y melaza. En este trabajo se observó que el consumo de sacarosa, fructosa y glucosa es alto en las primeras 24 horas del cultivo, previas al estado estacionario en el que se lleva a cabo una inhibición por producto (Figura 3. Determinación de pH y ATT de FAL con 5% de *Lactobacillus plantarum* como cultivo iniciador y con concentraciones de papaya).

A pesar de que el cultivo iniciador es homofermentativo, se halló ácido acético en concentraciones bajas, el cual pudo haberse producido por microorganismos heterofermentativos y aunque ambos ácidos orgánicos mostraron efecto inhibitorio, el grupo acetilo puede ser utilizado como sustrato por algunos microorganismos, por esta razón se prefiere la fermentación homoláctica. De acuerdo con los datos experimentales, el 30% de papaya suplementado con 10% de melaza como fuente de carbono (519.3 ± 64.61 mg azúcares/g melaza) fueron las condiciones seleccionadas para los experimentos posteriores, para asegurar una producción estable de ácido a lo largo de la fermentación.

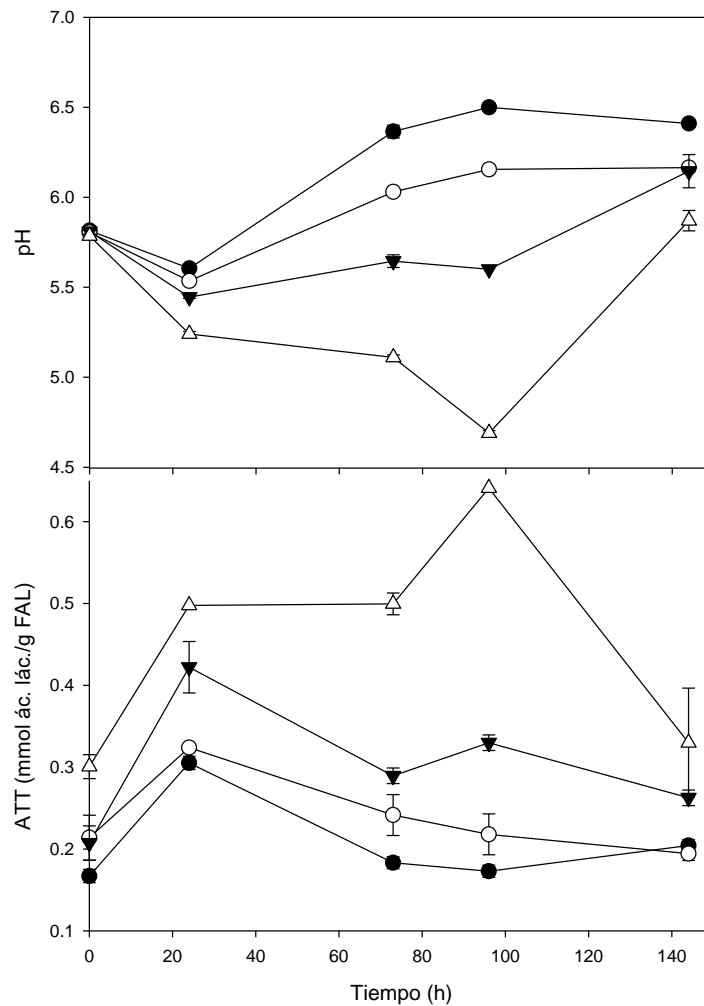


Figura 3. Determinación de pH y ATT de FAL con 5% de *Lactobacillus plantarum* como cultivo iniciador y con concentraciones de papaya de (●) 10%, (○) 20%, (▼) 30% y (△) 50% como fuente de carbono.

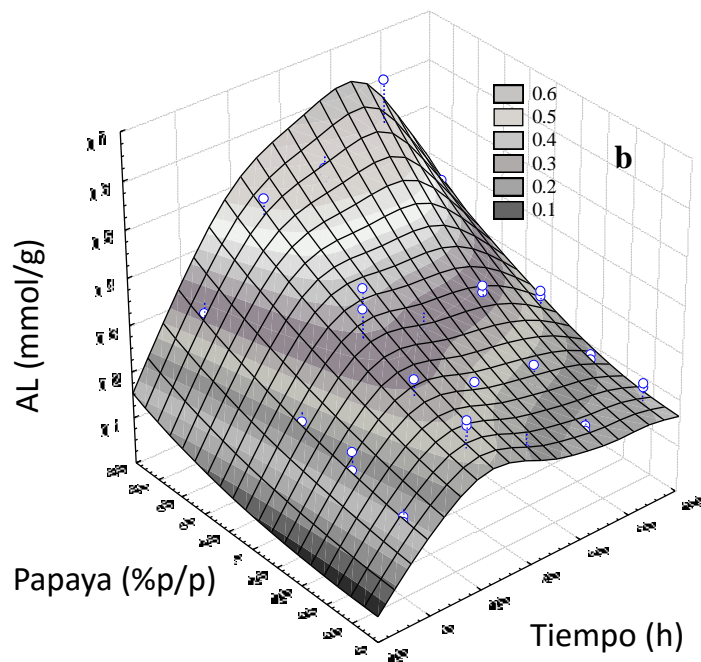


Figura 4. Representación tridimensional del tiempo de producción de AL de las fermentaciones inoculadas con 5% (p/p) de *L. plantarum* y variaciones de los niveles de papaya.

7.3 Efecto del nivel de inóculo en la FAL

Se evaluó el efecto de la concentración de inóculo en la producción de ácido láctico (AL) en la FAL con 10% melaza y distintos niveles de inóculo, con el objetivo de determinar los parámetros cinéticos bacterianos. Las curvas de ajuste al modelo de Gompertz se muestran en la figura 5.

La producción de ácido láctico presentó diferencias significativas (<0.05) en todos los niveles de inóculo. Respecto a los parámetros cinéticos, en el caso de los valores de P_{max} y los de V_{max} hubo un incremento al aumentar los niveles de inóculo, especialmente al 20%, mientras que a 5% y a 10% el incremento a la tasa de acidificación (k) no fue significativo, así como el pH después de 120 h de fermentación. Dichos datos se pueden observar en la tabla 1.

Por lo tanto, se eligió el 5% de cultivo iniciador para experimentos posteriores considerando el costo que implica para los experimentos posteriores considerando su costo en un escalamiento de proceso.

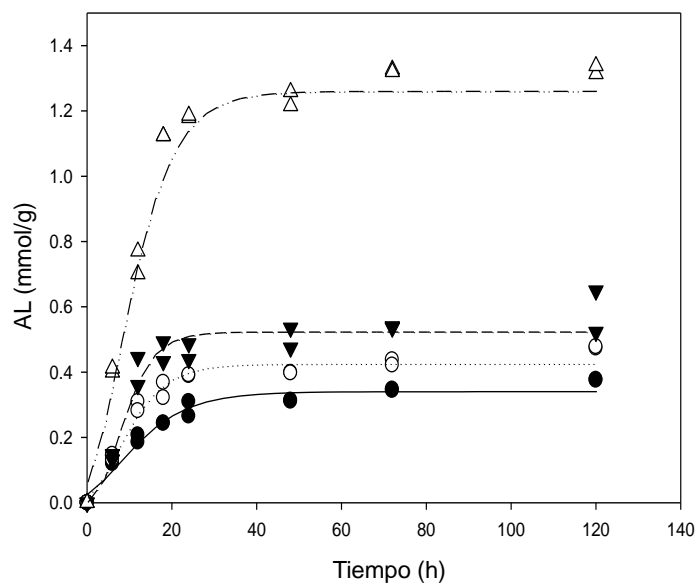


Figura 5. Perfil de producción de ácido en las fermentaciones y ajustado al modelo de Gompertz con 10% (p/p) de melaza como fuente de carbono variando el nivel de inóculo (●) 5, (○) 10, (▼) 20 (%v/p) y con 5 % (p/p) de inóculo y (Δ) con 30% (p/p) de papaya

Tabla 1. Constantes cinéticas del ácido láctico en desperdicios de atún con 10% (p/p) de melaza añadida para la producción de hidrolizados proteicos con inóculo de *Lactobacillus plantarum*.

<i>Papaya</i>	<i>Nivel de</i>	P_{max}	k	V_{max}	R^2	pH
(%p/p)	<i>inóculo</i>	(mmol/g)	(h ⁻¹)	(mmol/gh)		
	(%v/p)					
0	5	0.344	0.115	0.015	0.98	4.88±0.03 ^a
0	10	0.429	0.163	0.026	0.97	4.72±0.05 ^a
0	20	0.526	0.220	0.043	0.95	4.49±0.03 ^c
30	5	1.263	0.142	0.066	0.99	4.62±0.03 ^b

Los valores con diferentes letras de superíndice en la misma columna mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con la prueba de Tukey–Kramer de comparaciones múltiples.

7.4 Parámetros de la fermentación

La caracterización de la FAL de atún consiste en la determinación de parámetros que se relacionan directamente con el crecimiento de las BAL, como lo es la acidez debida a la producción de ácido láctico y la disminución de pH, así como otros parámetros que permiten determinar la conversión de la materia prima en producto. En la Figura 6 se muestra la acidificación debida al crecimiento bacteriano. Para los valores del pH, éstos disminuyen drásticamente a las 24 horas y se mantienen en valores bajos hasta el final de la fermentación como consecuencia de la acidificación del medio debido al metabolismo de las bacterias lácticas inoculadas en el ensilado y que aumenta la concentración de ácido láctico sostenidamente hasta las 96 horas, disminuyendo levemente en las últimas 24 horas. Este hecho se puede atribuir a que el ácido láctico sirve como sustrato para otro tipo de microbiota.

El grado de hidrólisis (GH) se determinó durante la fermentación, siendo de 89% a las 120 h. Valores menores que éste, que van de 4.7 al 30%, se han reportado para hidrólisis enzimática en pescado (Chalamaiah y *col.* 2012).

Esta actividad tan alta se puede explicar mediante las actividades proteolíticas durante la FAL. La actividad de proteasa ácida fue alta cuando la fermentación comenzó pero disminuyó hasta tener una actividad nula a las 96 horas. Sin embargo, la actividad neutra se mantuvo a lo largo de la fermentación, lo que resultó en un incremento del GH. Tomando en cuenta que la actividad proteasa en pescado es mayor en la neutralidad o en condiciones ácidas, la actividad observada pudo deberse a enzimas digestivas como las del tipo tripsina y quimotripsina (Sriket y *col.* 2014). A pesar de las condiciones ácidas durante la FAL, la actividad de las proteasas ácidas disminuyó durante tiempos de reacción largos, lo cual puede ser atribuido a hidrólisis mediante otras proteasas como son las digestivas de pescado, papaína y microbianas. De esta manera, las pepsinas digestivas encontradas en las vísceras de atún aleta amarilla pueden presentar actividad en las condiciones de la FAL. Se ha

Resultados y Discusión

reportado que las pepsinas provenientes de animales marinos tienen un intervalo de pH amplio (pH 2.0–4.0) así como un intervalo amplio de estabilidad de temperatura (37-55°C) comparado con las pepsinas de mamíferos (Simpson y col. 2010). Además, la fuente de papaya utilizada en este experimento presentó valores de actividad proteasa neutra de 0.767 ± 0.08 U/mg fruta.

De acuerdo con Skelton (1968), la papaína de *Carica papaya* tiene un intervalo de temperatura desde los 25 °C (cerca del 65% de la actividad máxima) hasta los 70 °C (cerca de 60% de la actividad máxima) con un óptimo de 40 °C. El pH va de 5 (70% de máxima actividad) a 8 (85% de actividad máxima) y el óptimo varía de 6 mínimo a 6.5 máximo. La actividad proteolítica de proteasas exógenas con *L. plantarum* se reportan a pH mayor a 4.0, similar a los de la FAL, con poblaciones de células viables de 1.2×10^6 a 2.0×10^6 UFC/mL (Khalid y Marth, 1990). Esto es más bajo que las 10^8 UFC/mL en esta FAL, aunque las proteasas de los materiales muestran una actividad relativamente alta.

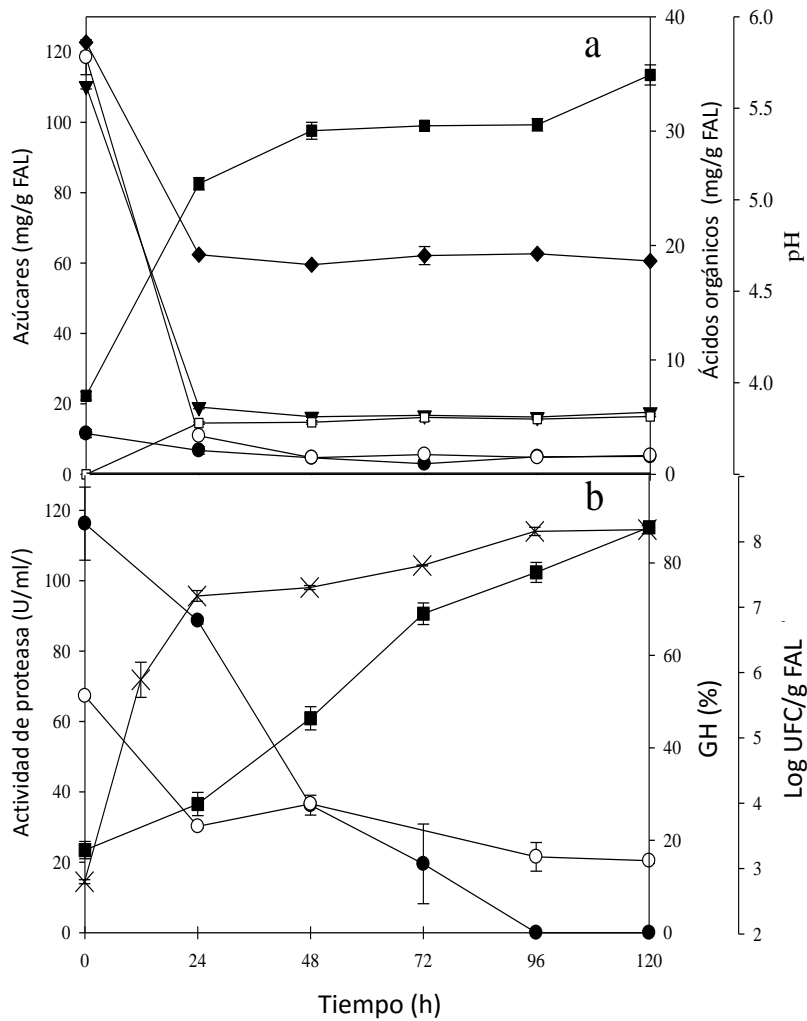


Figura 6. FAL con papaya al 30% (p/p) y melaza como fuente de carbono, determinaciones de a) azúcares y ácidos orgánicos determinados por HPLC: (◆) pH, (●) sacarosa, (○) glucosa, (▼) fructosa, (■) AL y (□) ácido acético y b) (●) proteasas ácidas, (○) proteasas neutras, (■) GH y (×) Cuenta de BAL.

7.5 Digestibilidad *in vitro*

Se considera importante la digestibilidad en la FAL cuando se pretende utilizarla para la dieta animal y para la formulación de medios de cultivo microbiológicos, en el que el porcentaje de digestibilidad sea tan cercano al 100% como sea posible, ya que esto implica que existen fracciones proteicas, péptidos y aminoácidos disponibles para su asimilación inmediata, independientemente de las necesidades de aminoácidos esenciales que se requieran para cada tipo de aplicación potencial en formulaciones. Respecto a los datos de digestibilidad *in vitro*, en la figura 7 se observan valores altos a lo largo de la FAL, siendo de 89.32% al final de todo el proceso.

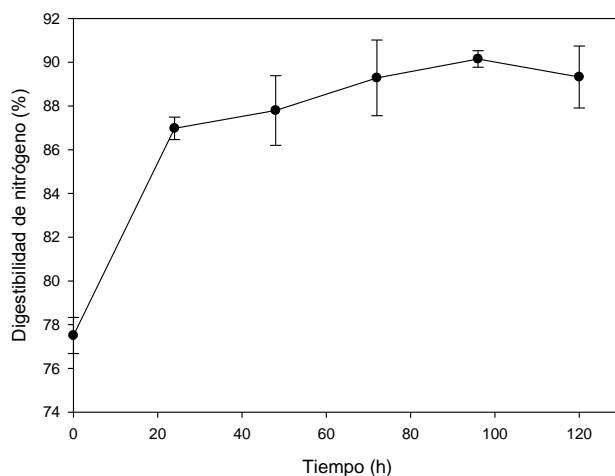


Figura 7. Digestibilidad *in Vitro* de hidrolizados proteicos a lo largo de la FAL

Para determinar si las enzimas proteolíticas contenidas en la papaya son esenciales en la actividad hidrolítica de proteínas de la FAL, se determinó la actividad de proteasas neutras en FAL con papaya-glucosa y glucosa como fuente de carbono. Contrario a lo esperado, la actividad proteolítica es mayor en la FAL de glucosa que en el de papaya-glucosa, como se observa en la figura 8. Este hecho se puede atribuir a que la papaína, la enzima proteolítica neutra contenida en la

Resultados y Discusión

papaya, tiene una temperatura óptima de 65°C para la reacción que cataliza (Kilara y col. 1977). La temperatura de la FAL es de 30°C, por lo que la actividad se le puede atribuir a otro tipo de proteasas contenidas en el ensilado.

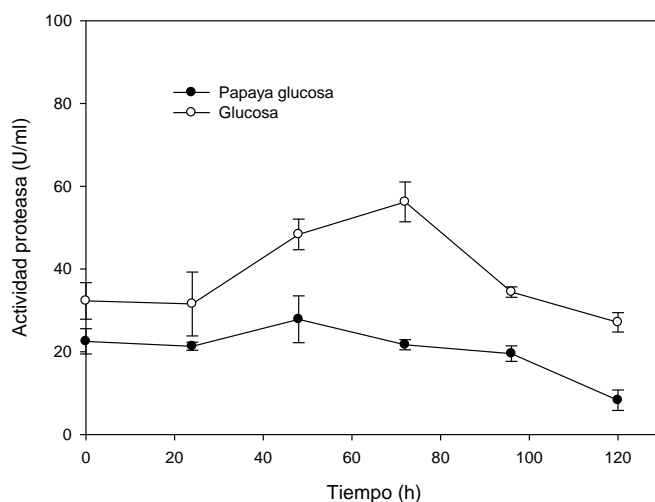


Figura 8. Actividad proteasa neutra de FAL de papaya-glucosa y de glucosa como fuente de carbono.

La concentración de proteína soluble al paso del tiempo evidencia la actividad hidrolítica no sólo de la actividad microbiana, sino la posible actividad de las enzimas endógenas de las vísceras de atún y de la papaya añadida. Como se muestra en la Figura 9. Proteína soluble presente en la FAL con papaya y melaza como fuente de carbono., existen dos curvas. Una representa la concentración total de proteína soluble a lo largo de la fermentación y la otra representa la concentración ajustada con base en la proteína inicial determinada. La intención de dicho ajuste es descartar las proteínas solubles presentes en el ensilado perteneciente a fracciones sarcoplásmicas y otro tipo de proteínas o péptidos derivados de la actividad proteolítica endógena. De esta manera se

Resultados y Discusión

puede determinar que una disponibilidad real de hidrolizados proteicos comienza a partir de las 48 horas durante la fermentación.

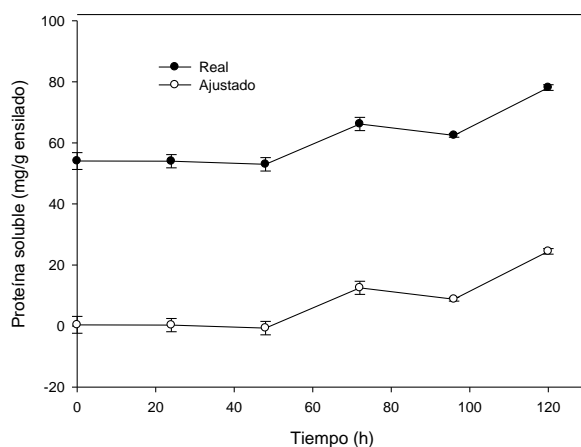


Figura 9. Proteína soluble presente en la FAL con papaya y melaza como fuente de carbono.

En esta sección se puede concluir que se caracterizó el producto de la fermentación láctica de residuos pesqueros y agrícolas, el cual resultó estable y con un alto grado de hidrólisis y digestibilidad. El grado más alto de hidrólisis proteica fue de 87.71% y fue alcanzado a las 120 h de fermentación. También se determinó el consumo de azúcares, los cuales se relacionan directamente con la producción de ácido láctico (AL) y finalmente la concentración máxima de AL generado, la constante de la tasa de acidificación y la tasa de máxima producción de ácido láctico se estimaron con el modelo de Gompertz con datos de 5 días (120h) de fermentación y éstos fueron de 1.27 mmol AL/g, 0.142 h^{-1} y 0.067 mmol AL/gh , respectivamente.

7.6 Actividad antirradicalaria (AAR)

Para realizar el análisis de la AAR en la FAL y las fracciones proteicas obtenidas de esta se evaluó primero con el método espectrofotométrico, el cual tiene la ventaja de ser usado ampliamente y a la baja complejidad para llevarlo a cabo basándose en preparaciones previas al ensayo y equipo. Se realizó un ajuste de los datos con la función Probit, dicha función determina un valor conocido como IC_{50} , que es la cantidad de proteína necesaria para la inhibición de la actividad del radical DPPH en un 50%. La primera determinación de la FAL fue al inicio ($t=0h$) y al final del proceso ($t=120h$) para fracciones sarcoplásmicas y miofibrilares. En el caso de la primera se trata de proteínas de diversos orígenes completamente solubles en agua a las condiciones dadas y en la segunda a proteínas provenientes de fibras musculares cuya solubilidad se ve favorecida en soluciones salinas. De acuerdo con los datos obtenidos, que se enlistan en la tabla 2; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** y las curvas que describen el comportamiento de la AAR que se pueden observar en la figura 10, la respuesta antirradicalaria no aumenta durante el transcurso de la fermentación, sino que requiere aumentar la concentración de proteína para lograr inhibir al radical en un 50%, esto se puede observar en la fracción sarcoplásmica y en el extracto crudo con $t=120$ horas. En el caso de las proteínas miofibrilares, la respuesta permanece sin variación y con valores bajos de IC_{50} . Sin embargo, las proteínas de la fracción miofibrilar no se encuentran en la misma abundancia que las sarcoplásmicas ya que la mezcla de desperdicios de atún no consiste completamente de músculo esquelético, además de que se necesita que sea músculo fresco que no haya sido sometido a cocción para poder obtener proteínas de alta calidad que no muestren indicios de degradación. Dicha degradación se puede observar en los valores altos de grado de hidrólisis incluso al inicio de la FAL. Por esa razón se decidió hacer el análisis durante todo el transcurso del tiempo de la fermentación sin fraccionar tomando en cuenta la abundancia de proteínas sarcoplásmicas solubles en agua.

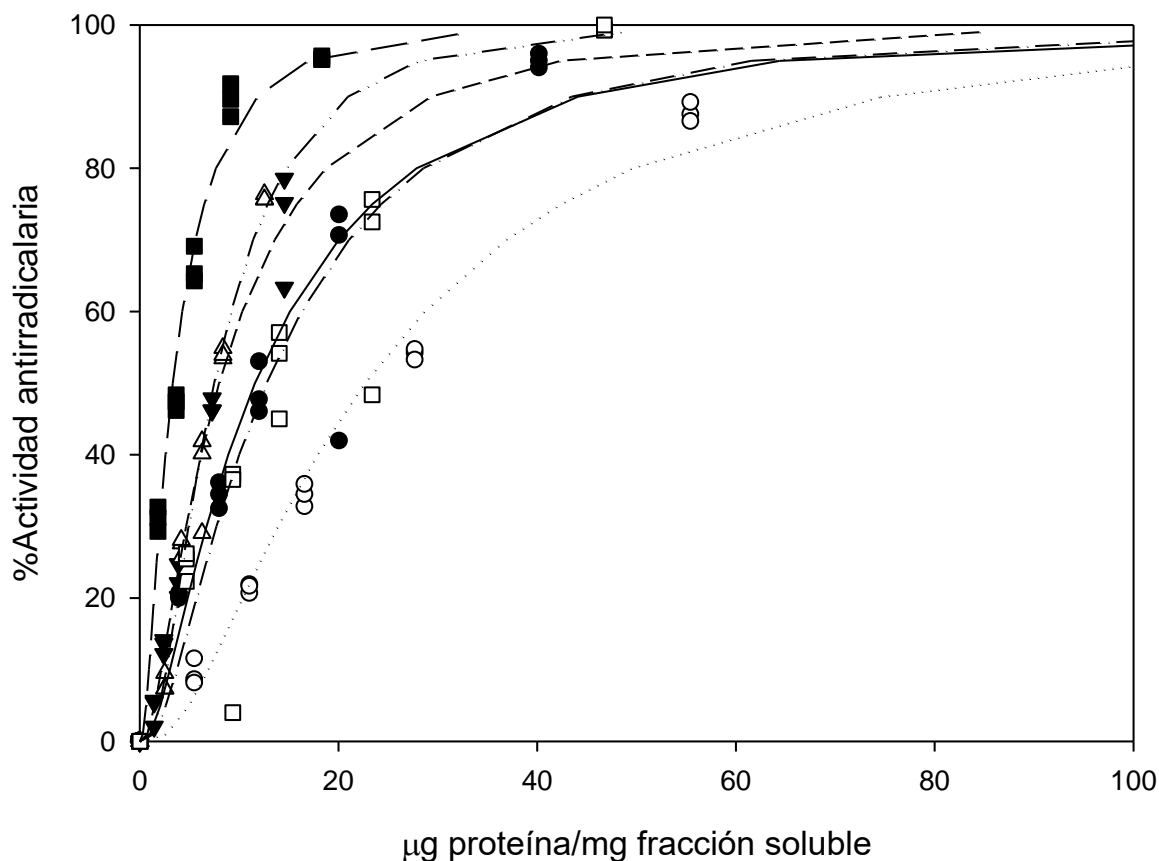


Figura 10. Análisis de actividad antirradicalaria de las fracciones proteicas extraídas de la FAL con papaya y melaza como fuente de carbono. Los datos en dispersión muestran el ajuste Probit correspondiente. Se representan los datos en dispersión como: ●Fracción sarcoplásmica t=0h, ○ Fracción sarcoplásmica t=120h, ▼Fracción miofibrilar t=0h, △Fracción miofibrilar t=120h, ■ Extracto crudo t=0h, □ Extracto crudo t=120h. El ajuste Probit correspondiente se representa como: -----Fracción sarcoplásmica t=0h, Fracción sarcoplásmica t=120h, - - - -Fracción miofibrilar t=0h, ······Fracción miofibrilar t=120h, --- --- ---Extracto crudo t=0h, ······---Extracto crudo t=120h.

Tabla 2. Valores de IC₅₀ obtenidos a partir del ajuste Probit del análisis de las fracciones proteicas extraídas de la FAL con papaya y melaza como fuentes de carbono.

<i>Fracción</i>	<i>IC₅₀ (µg prot /mg fracción soluble)</i>	<i>Error estándar (±)</i>
Sarcoplásmicas 0h	11.59	0.43
Sarcoplásmicas 120h	22.59	0.79
Miofibrilares 0h	7.99	0.35
Miofibrilares 120h	7.50	0.22
Extracto Crudo 0h	3.35	0.14
Extracto Crudo 120h	12.78	0.44

Para poder explicar con más detalle la actividad antirradicalaria en la FAL sin fraccionar, se hizo un análisis durante el transcurso del tiempo de la fermentación, el cual se muestra en la Figura 11. **Análisis de actividad antirradicalaria de la FAL con papaya y melaza como fuente de carbono, representando los datos en dispersión como: ●0h, ○24h, ▼48h, △72h, ■96h, □120h. El ajuste Probit correspondiente se representa como: ----- 0h, ······ 24h, - - - - - 48h, ······- - - - - 72h, --- --- --- 96h, ······- - - - -120h..** De acuerdo con los datos obtenidos, la actividad resulta casi sostenida durante el tiempo de la fermentación, con valores que oscilan entre 21.24 y 27.19 µg proteína/mg ensilado. De acuerdo con reportes como el de Biao-Shi y *col.* (2008), existe actividad antirradicalaria en los pigmentos contenidos en la melaza, por lo que se decidió hacer un análisis de la actividad antirradicalaria de las fermentaciones de desperdicios de atún con papaya-glucosa y glucosa como fuente de carbono.

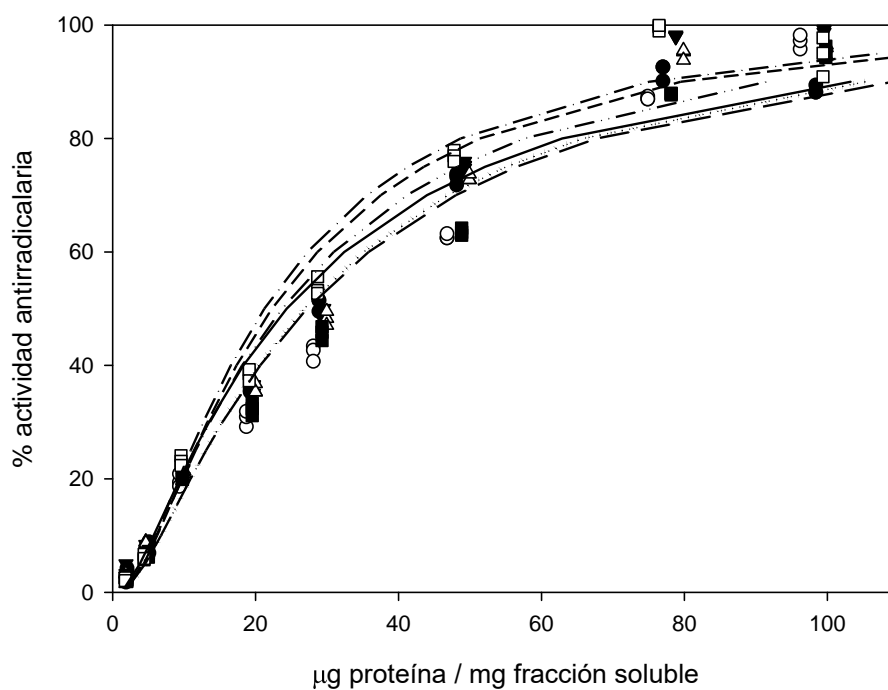


Figura 11. Análisis de actividad antirradicalaria de la FAL con papaya y melaza como fuente de carbono, representando los datos en dispersión como: ●0h, ○24h, ▼48h, △72h, ■96h, □120h. El ajuste Probit correspondiente se representa como: ----- 0h, 24h, - - - - - 48h, ······ 72h, - - - - - 96h, ······ 120h.

Tabla 3. Valores de IC₅₀ obtenidos a partir del ajuste Probit del análisis la FAL de papaya y melaza como fuente de carbono por el método espectrofotométrico.

<i>horas</i>	<i>IC₅₀ (μg prot /mg ensilado)</i>	<i>Error estándar (±)</i>
0	24.35	0.85
24	26.76	0.90
48	22.30	0.73
72	23.70	0.80
96	27.20	0.92
120	21.24	0.69

Para poder determinar la influencia de la melaza en la actividad antirradicalaria en la FAL, se caracterizaron tratamientos en los que se sustituyen las fuentes de carbono con glucosa, en este caso dos: papaya-glucosa y glucosa. El parámetro de actividad antirradicalaria se determinó a las mismas concentraciones de proteína que las muestras de FAL con papaya y melaza. Los datos experimentales no alcanzaron el 50% de la actividad antirradicalaria, como se muestra en la figura 12 y no fueron ajustados al modelo Probit, debido a que no presentan una tendencia que pueda ajustarse a una función sigmoideal. Sin embargo, se observó que la actividad en estas FAL con glucosa también resulta sostenida, por lo que se pueden observar dos hechos importantes: uno de ellos es la contribución de la papaya en la AAR de la FAL, en la cual dicha actividad resulta sostenida a pesar de su presencia o no, lo que sugiere el hecho de que su participación en la actividad antirradicalaria de la FAL no es relevante. El otro aspecto destacado en este análisis es la actividad de las proteínas a lo largo de la fermentación, la cual se mantiene sostenida durante el tiempo a pesar de la ausencia o presencia de diferentes fuentes de carbono, por lo que existe evidencia de la actividad antirradicalaria de las proteínas de la FAL por sí solas.

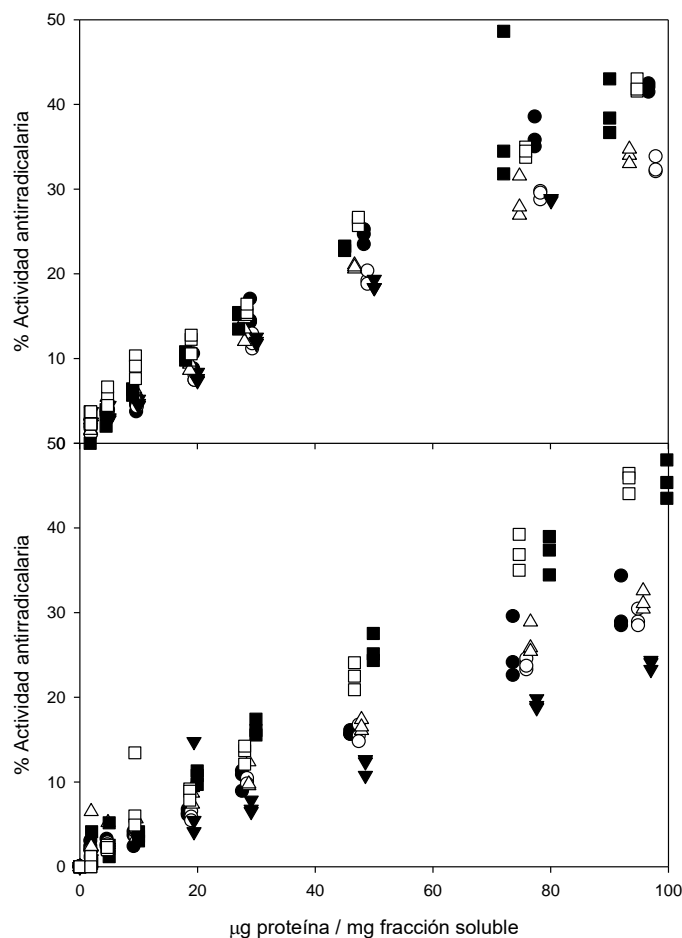


Figura 12. Valores de actividad antirradicalaria en la FAL con diferentes fuentes de carbono representadas como a) papaya-glucosa y b) glucosa, representando ●0h, ○24h, ▼48h, △72h, ■96h, □120h en ambas figuras.

Debido a que no resulta evidente algún efecto de la fermentación en las curvas de actividad antirradicalaria determinadas por el método espectrofotométrico y al hecho de que una determinación espectrofotométrica en un sistema heterogéneo como la FAL no tiene especificidad hacia radicales libres cuya actividad se determina mediante cambios de color, se realizaron determinaciones de la AAR mediante resonancia paramagnética electrónica. Esta técnica de

Resultados y Discusión

espectroscopía se caracteriza por detectar, con alta sensibilidad, distintos tipos de moléculas con electrones no apareados, como son los radicales libres estables, metales de transición, metaloproteínas, entre otros. Los radicales libres se reconocen por un espectro característico que varía en la intensidad de la señal detectada de acuerdo a la concentración del radical, por lo que no existe riesgo de interferencia por otro compuesto que carezca de propiedades paramagnéticas. Los valores de IC_{50} ajustados al modelo Probit a partir de los análisis de EPR en las muestras de la FAL se muestran en la Figura 13. Actividad antirradicalaria de hidrolizados proteicos determinados por EPR: a) espectros de EPR en el intervalo de concentraciones para la determinación del IC_{50} al ajustar datos a un modelo Probit durante la duración de la fermentación. b) EPR de los ingredientes de la fermentación al tiempo inicial al IC_{50} de 23.24 $\mu\text{g/g}$, las concentraciones utilizadas en la mezcla de papaya, melaza y desperdicios de atún son 6.8, 2.3 and 13.7 $\mu\text{g/g}$, respectivamente., en el que el grupo con la AAR más alta fue de 72 a 96 horas con valores de IC_{50} de 5.75 ± 1.04 $\mu\text{g/g}$ FAL y 7.6 ± 1.7 $\mu\text{g/g}$ FAL respectivamente. Sin embargo, las muestras de 24 y 48 horas muestran valores de IC_{50} de 10.82 ± 1.9 y 9.06 ± 1.06 $\mu\text{g/g}$ FAL respectivamente. En este sentido, las proteínas, melanoidinas y polifenoles de la fruta pueden explicar de manera precisa que la AAR observada (IC_{50} de 23.24 ± 1.04 $\mu\text{g/g}$ FAL) al principio de la FAL (Figura 13. Actividad antirradicalaria de hidrolizados proteicos determinados por EPR: a) espectros de EPR en el intervalo de concentraciones para la determinación del IC_{50} al ajustar datos a un modelo Probit durante la duración de la fermentación. b) EPR de los ingredientes de la fermentación al tiempo inicial al IC_{50} de 23.24 $\mu\text{g/g}$, las concentraciones utilizadas en la mezcla de papaya, melaza y desperdicios de atún son 6.8, 2.3 and 13.7 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.3). Sin embargo, la AAR fue recuperada al liberar hidrolizados proteicos (Figura 13. Actividad antirradicalaria de hidrolizados proteicos determinados por EPR: a) espectros de EPR en el intervalo de concentraciones para la determinación del IC_{50} al ajustar datos a un modelo Probit durante la duración de la fermentación. b) EPR de los ingredientes de la fermentación al tiempo inicial al IC_{50} de 23.24 $\mu\text{g/g}$, las concentraciones utilizadas en la mezcla de papaya, melaza y desperdicios de atún son 6.8, 2.3 and 13.7 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.). De

igual manera, ha reportado que las melanoidinas provenientes de las melazas de caña pueden ser degradadas por la formación de H_2O_2 proveniente de microorganismos (Chandra y col. 2008). *Lactobacillus plantarum* se caracteriza por producir peróxido de hidrógeno en su metabolismo bajo condiciones aerobias (Quatravaux y col. 2006). Je y col. (2007) y Bougatef y col. (2010) han reportado también actividades relativamente altas en péptidos con pesos moleculares bajos que suelen estar incluidos de manera críptica en la secuencia de alguna proteína precursora y liberada mediante hidrólisis, por lo tanto la contribución a la AAR a partir de otros componentes en la mezcla de la FAL debe tomarse en consideración, como la papaya que también presenta AAR atribuida a los polifenoles, los cuales son componentes funcionales contenidos comunmente en frutas frescas y secas, así como polisacáridos solubles en agua unidos a ácidos urónicos (Wang y col. 2008, Kumar y col. 2010, Zhang y col. 2012). Generalmente, la AAR en desperdicios de pescado se ha atribuido a proteínas y péptidos con alta hidrofobicidad como un factor importante para incrementar la interacción con radicales libres (Chen y col. 1998, Elias y col. 2006, Chalamaiah y col. 2012), por lo tanto, los aminoácidos con grupos hidrofóbicos como Val, Ile, Leu, Phe, Met y Pro están relacionados con la AAR, así como Tyr o His que tienen grupos fenilo e imidazol respectivamente (Pihlanto y Korhonen, 2003).

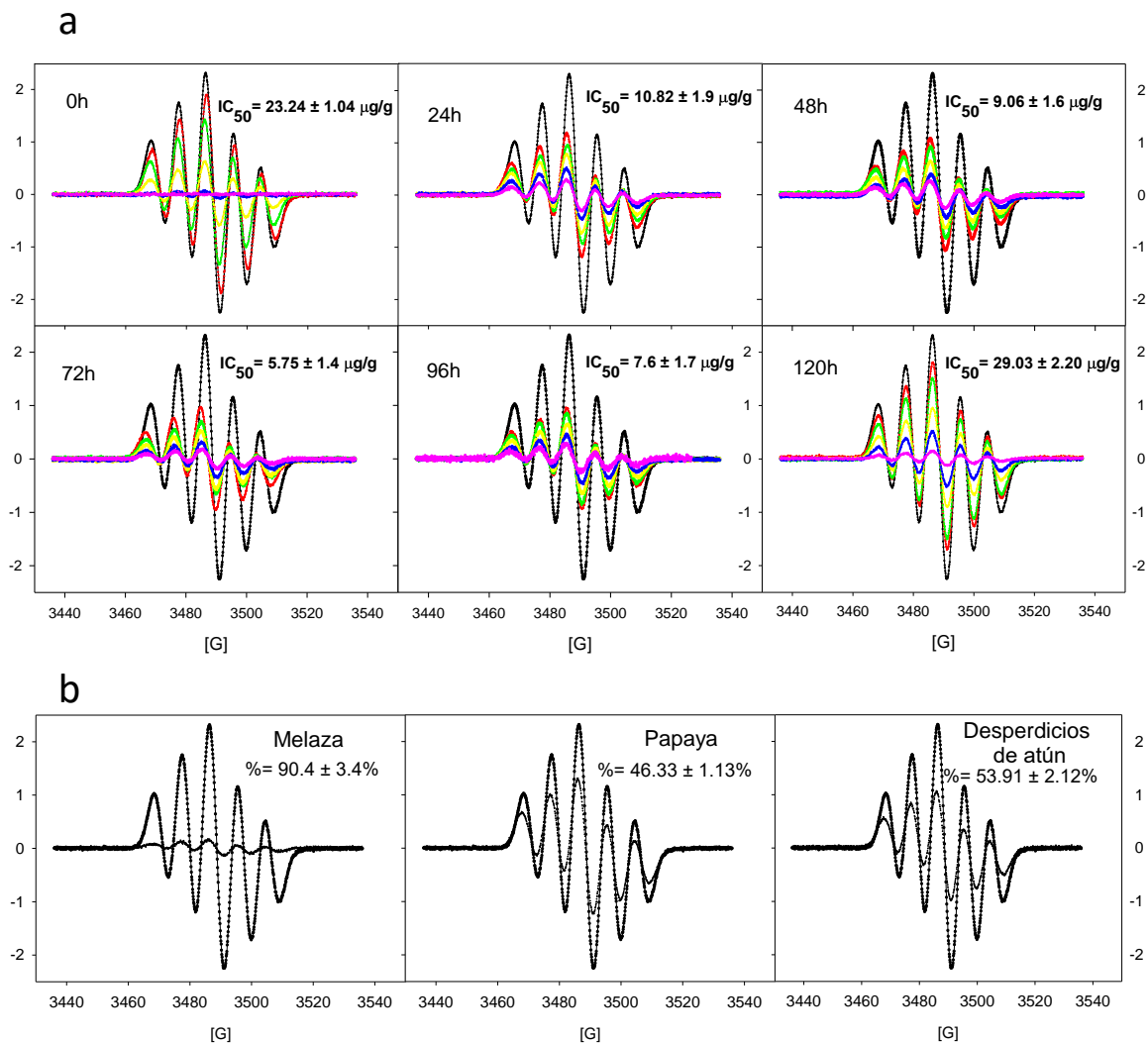


Figura 13. Actividad antirradicalaria de hidrolizados proteicos determinados por EPR: a) espectros de EPR en el intervalo de concentraciones para la determinación del IC_{50} al ajustar datos a un modelo Probit durante la duración de la fermentación. b) EPR de los ingredientes de la fermentación al tiempo inicial al IC_{50} de $23.24 \mu\text{g/g}$, las concentraciones utilizadas en la mezcla de papaya, melaza y desperdicios de atún son 6.8 , 2.3 and $13.7 \mu\text{g/g}$, respectivamente.

7.7 Análisis de peso molecular de proteínas y péptidos obtenidos en la FAL

Se realizó un análisis de peso molecular de proteínas de fracciones sarcoplásmicas y miofibrilares al inicio y al final de la FAL (0 y 120h). Para poder mostrar las proteínas de la fracción miofibrilar fue necesario concentrarlas mediante ultrafiltración con membrana de corte de 3 kDa debido a la baja concentración de esas proteínas (Figura 14. Electroferograma SDS-PAGE de las fracciones proteicas del FAL donde se representan el control a las 0h, las fracciones sarcoplásmicas, miofibrilares y miofibrilares concentradas con una membrana con corte de 3kDa del tiempo 0 y 120h.). Un aspecto importante en este análisis es la prevalencia de bandas de peso molecular alto (250 kDa) en las fracciones miofibrilares, lo que coincide con el peso molecular de proteínas de músculo, aunque al hallarse también en las fracciones sarcoplásmicas se pueden atribuir a otro tipo de proteínas presentes en la FAL que no necesariamente sean de origen muscular, lo que justifica que no se consideren las proteínas miofibrilares para su extracción y caracterización. Otro aspecto que destaca es una banda de peso molecular que prevalece en un intervalo de 20-22 kDa, la cual puede estar relacionada con la AAR presente en la FAL.

Resultados y Discusión

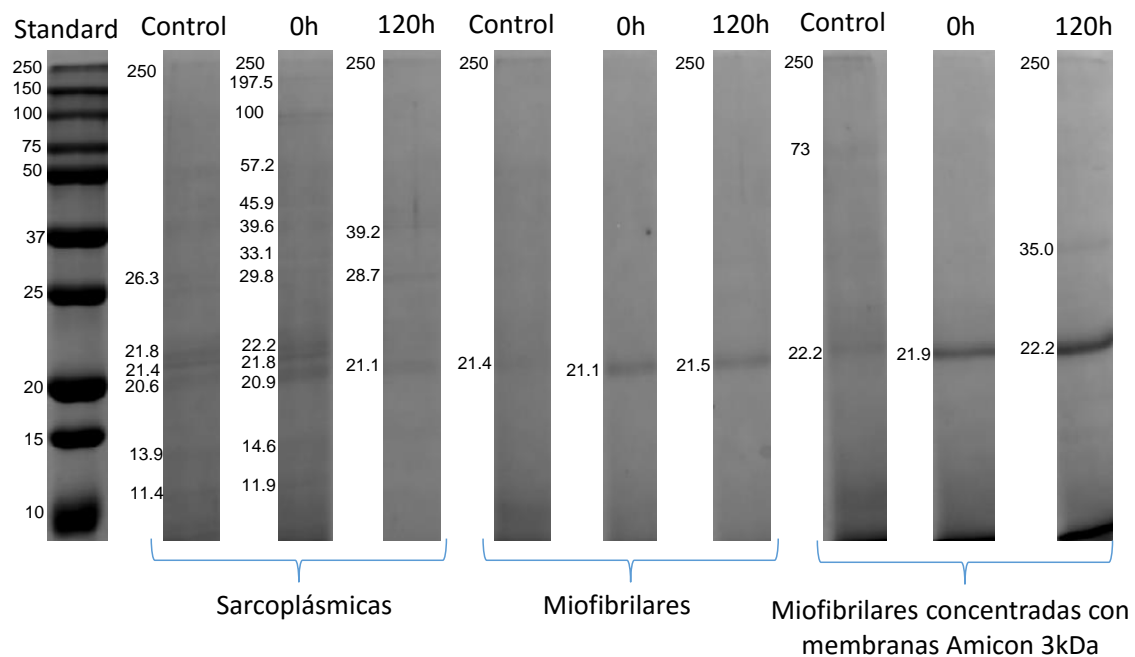


Figura 14. Electroferograma SDS-PAGE de las fracciones proteicas del FAL donde se representan el control a las 0h, las fracciones sarcoplásmicas, miofibrilares y miofibrilares concentradas con una membrana con corte de 3kDa del tiempo 0 y 120h.

Resultados y Discusión

Para poder visualizar con claridad las proteínas presentes en la FAL en diferentes intervalos de peso molecular se realizó un fraccionamiento mediante membrana de ultrafiltración con un corte de 5 kDa. La fracción de retenidos de la membrana se analizó con un gel Laemmli para intervalos de peso molecular amplios y el permeado tuvo que concentrarse mediante cartuchos de C-18 para poder visualizar las bandas de proteína en un gel de tricina para pesos moleculares bajos, debido a que se diluyen en el proceso de ultrafiltración. Se puede observar en la figura 15 que existen bandas que prevalecen a lo largo de toda la determinación en los distintos pesos moleculares en los electroferogramas “a” y “b”, así como también bandas que dejan de aparecer a partir de los 15 y 10 kDa en el gel “a”. Los geles de acrilamida no ofrecen resolución para determinar la presencia de péptidos de muy bajo peso molecular. De acuerdo con Schägger (2006), en la técnica más sensible sólo se pueden observar péptidos de hasta 1 kDa. Si se buscan péptidos con actividad inhibidora de la ECA, esta actividad se puede encontrar desde péptidos de dos residuos en adelante (Kim y col. 2012). Los dipéptidos pueden tener un peso molecular de 200 Da, que aumenta hasta 2000 Da en los péptidos reportados (Harnedy y col, 2012; Marques y col, 2012). En el caso de la actividad antirradicalaria, depende de los aminoácidos capaces de estabilizar radicales libres y del mecanismo para estabilizarlos.

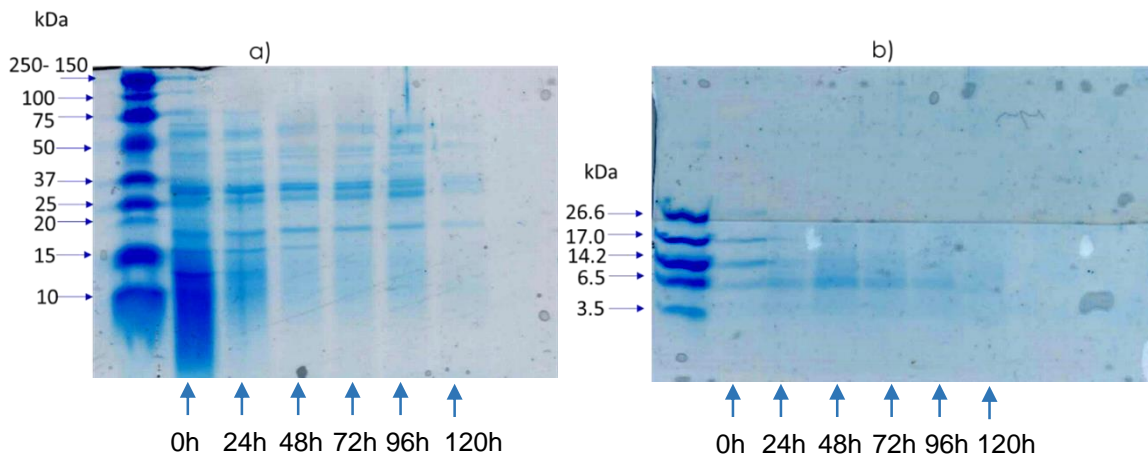


Figura 15. Electroferogramas para: a) SDS-PAGE Laemmli para las proteínas concentradas en la membrana de ultrafiltración con peso molecular mayor a 5 kDa y b) SDS-PAGE Tricina para proteínas y péptidos del permeado con peso molecular menor a 5 kDa para todos los tiempos de la fermentación.

La última caracterización realizada a las proteínas y péptidos de la FAL sin algún tipo de fraccionamiento se muestra en la Figura 16. **Electroferogramas de hidrolizados proteicos obtenidos por FAL usando papaya y melaza como fuente de carbono. Standard: marcador de masa molecular, 0, 24, 48, 72, 96 y 120. a) Laemmli SDS- PAGE b) SDS-PAGE tricina.**, la cual muestra los electroferogramas de las muestras de la FAL en dos geles, uno para resolución en un intervalo amplio de pesos moleculares y otro para proteínas de pesos moleculares bajos. Se puede observar que después de las 24h las proteínas de masa molecular alta (> 260 kDa) no se detectaron pero un incremento en las proteínas de baja masa molecular evidencia la hidrólisis. El gel de SDS-Tricina muestra bandas de masas moleculares menores a 8.7 kDa para las 96 y 120 h de la FAL.

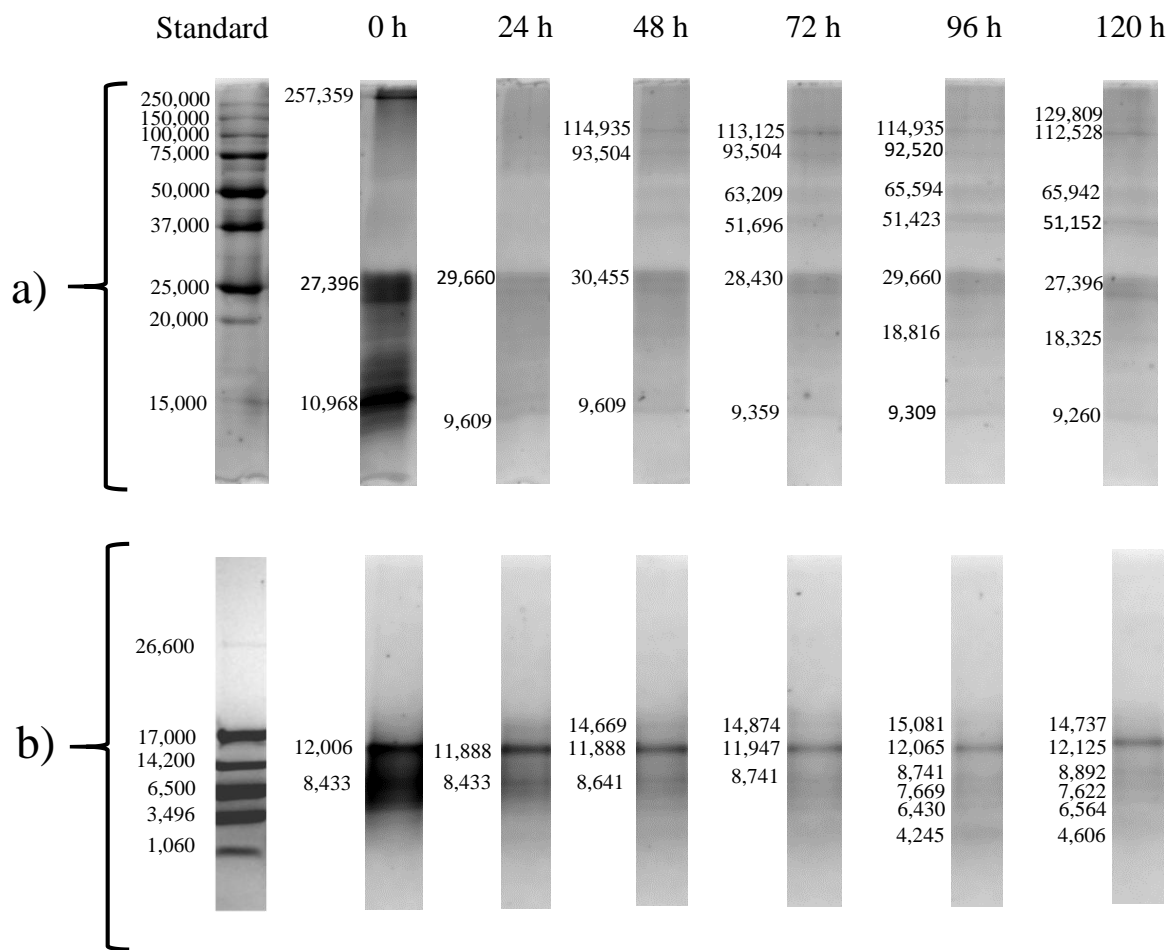


Figura 16. Electroferogramas de hidrolizados proteicos obtenidos por FAL usando papaya y melaza como fuente de carbono. Standard: marcador de masa molecular, 0, 24, 48, 72, 96 y 120. a) Laemmli SDS- PAGE b) SDS-PAGE tricina.

7.8 Pasteurización de muestras

Se realizó una pasteurización de las muestras de la FAL con el objetivo de determinar si existe una variación en la AAR al ser sometidas a un tratamiento térmico que inactiva microorganismos, sin considerar las variaciones de la hidrólisis. No se observan diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a la variación de porcentaje de AAR en ambos resultados a lo largo de la fermentación. Esto es favorable debido a que la actividad no va a ser comprometida por la exposición al cambio de temperatura, en vista de que haya necesidad de someter la FAL a este tratamiento para la inactivación de enzimas o microorganismos. En el caso de la fermentación, no se encontraron coliformes en las cuentas en placa y las proteasas siguen teniendo actividad a esa temperatura. En la Figura 17. Pasteurización de muestras, en la que ● son las muestras control y ○ son las muestras que fueron sometidas a tratamiento térmico a 60°C por 30 min. nutos se observa el cambio de AAR en las muestras que fueron sometidas a pasteurización comparadas con el control.

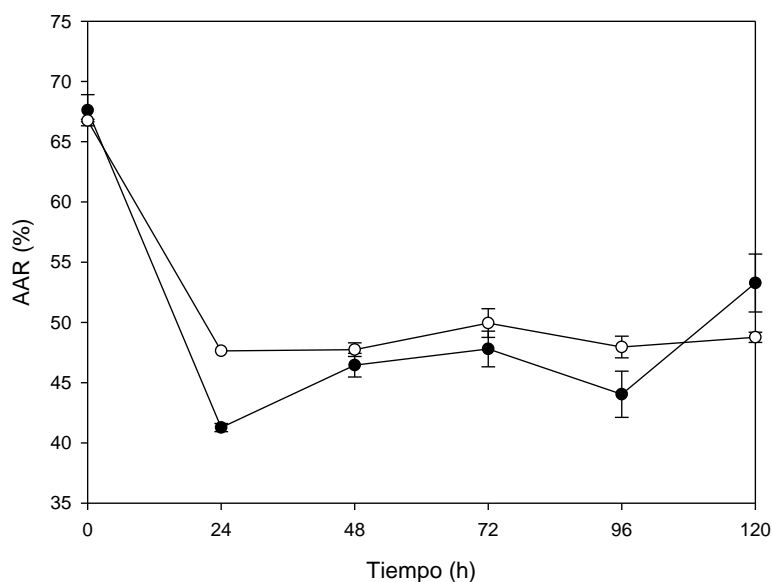


Figura 17. Pasteurización de muestras, en la que ● son las muestras control y ○ son las muestras que fueron sometidas a tratamiento térmico a 60°C por 30 min.

7.9 Relación de la AAR con la hidrólisis proteica

El aumento en la concentración de aminoácidos se relaciona con la hidrólisis proteica de acuerdo con la AAR observada. La concentración muestra un valor máximo al inicio de la fermentación seguido por un descenso hasta las 48 horas para remontar de nuevo, lo que se relaciona con el incremento significativo en GH. El descenso de GH después de las 96 horas se puede atribuir a la escasa actividad proteolítica. En este sentido, se ha reportado la efectividad de las proteasas ácidas en la hidrólisis enzimática de la proteína del esqueleto de atún, en el que la pepsina alcanzó un GH alto (74.5%) relacionándose con la síntesis de péptidos antioxidantes (Je y *col.* 2007). Sin embargo, a pesar de la pérdida de actividad proteolítica ácida, la AAR observada en esta FAL se puede atribuir a la actividad proteolítica neutral, como la de las enzimas tipo tripsina, de acuerdo con Klomklao y *col.* (2007). Estos autores reportaron que tres enzimas tipo tripsina purificadas del bazo de barrilete fueron estables en el intervalo de pH que va de 6 a 11. En este trabajo, hubo cambios menores en la concentración de la mayoría de los aminoácidos, excepto con Glu, Ala y Thr (Figura 18. Concentración de aminoácidos en la fermentación láctica de desperdicios de atún con papaya y melaza como fuente de carbono. La concentración de aminoácidos relacionados con la AAR de las muestras de la FAL se muestran en a), los demás aminoácidos se muestran en b). ($p < 0.05$)). Este último fue el único aminoácido cuya concentración disminuyó drásticamente de 4.45 a 1.44 g/16gN. Las variaciones detectadas en la concentración se pueden explicar mediante la actividad microbiana y su función como fuente de nutrientes para los microorganismos en la FAL, sin embargo la matriz es especialmente compleja como para asegurar esta afirmación. Adicionalmente, las condiciones ácidas pueden degradar aminoácidos lábiles como Trp y Thr. En lo que se refiere a Tyr e His, los cuales ya han sido señalados con actividad

Resultados y Discusión

contra radicales libres, el primero varió su concentración de acuerdo con la AAR detectada en la fermentación, contrario a la His, la cual permaneció constante. Otro aminoácido referenciado en este trabajo es Ala, cuya concentración se incrementó al final de la fermentación y se puede explicar considerando la actividad bacteriana presente en la FAL, de acuerdo con algunos reportes en los que *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus sake* promueven la producción de Glu y Ala mediante actividad proteolítica (Palumbo y col., 2004). Es importante notar que D-Ala juega un papel crucial en el ensamblaje de la pared celular de procariontas y *L. plantarum* requiere este aminoácido así como Glu para crecer y debido a esto se observan los incrementos. Por último, se ha reportado que la glucosa promueve significativamente la producción de Glu (Zareian y col. 2012). Sin embargo, después de 24 horas de FAL, la concentración de Glu disminuye significativamente y este efecto se puede explicar tomando en cuenta el sistema glutamato descarboxilasa, el cual está involucrado en la tolerancia al ácido de distintos géneros de bacterias, incluyendo a *L. plantarum* (Feehily y col. 2013)

La AAR en desperdicios de atún se le atribuye a proteínas y péptidos con alta hidrofobicidad que muestran propiedades antioxidantes como un factor importante para aumentar la interacción con radicales libres (Chen y col. 1998; Elias y col. 2006). Por lo tanto, aminoácidos con cadenas hidrofóbicas como Val, Ile, Leu, Phe, Met y Pro y otros aminoácidos relacionados con la AAR son la Tyr y His debiendo su actividad a los sustituyentes imidazol y fenilo (Pihlanto y col. 2003). La concentración de aminoácidos implicados en la AAR de las muestras de FAL se encuentra en la Figura 18. Concentración de aminoácidos en la fermentación láctica de desperdicios de atún con papaya y melaza como fuente de carbono. La concentración de aminoácidos relacionados con la AAR de las muestras de la FAL se muestran en a), los demás aminoácidos se muestran en b). ($p < 0.05$). El incremento en la concentración de aminoácidos se relaciona con la liberación mediante hidrólisis proteica, que coincide con la AAR observada.

Resultados y Discusión

La concentración mostró un máximo a las 0 h seguido por una disminución hasta las 48 h para aumentar de nuevo, lo cual coincide con el incremento significativo en el GH. Se ha reportado la efectividad de las proteasas ácidas en la hidrólisis enzimática de la proteína del lomo del atún, en el que la pepsina alcanzó un GH alto (74.5 %) dando como resultado la producción de péptidos antioxidantes (Je y col. 2007). Sin embargo, a pesar de la pérdida de actividad proteolítica ácida, la AAR observada a este tiempo de la FAL pudo deberse también a la actividad proteolítica neutral, como la de las enzimas tipo tripsina, de acuerdo con Klomkiao y col. (2007). En su trabajo se purificaron tres proteasas tipo tripsina del bazo de barrilete las cuales fueron estables en un intervalo de pH de 6 a 11.

En el presente trabajo hubo cambios mínimos durante la fermentación para los aminoácidos excepto por Glu, Ala y Thr (figura 18b). Este último fue el único aminoácido cuya concentración disminuyó drásticamente de 4.45 a 1.44 g/16g N. Las variaciones detectadas en la concentración pueden explicarse por la actividad y su función como fuente de nutrientes para microorganismos en la FAL, así como las condiciones ácidas pueden degradar aminoácidos lábiles como Trp y Thr. Respecto a la Tyr y a la His, que son inhibidores de radicales activos, el primero varió su concentración de acuerdo con la AAR detectada durante la fermentación contrario a la His, que permaneció estable.

La concentración de Ala se incrementó hacia el final de la FAL y eso puede explicarse por la actividad bacteriana, esta aseveración se fundamenta en reportes en los que se descubrió que *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus sake* promueven la producción de aminoácidos mediante actividad proteolítica, especialmente Glu y Ala (Palumbo y col. 2004). Cabe resaltar que la D-Ala tiene una función crucial en el ensamblaje de paredes celulares de procariontes y *L. plantarum* requiere este aminoácido para crecer, el cual es sintetizado como mezcla racémica y de este modo el incremento en la concentración de Ala. Adicionalmente, un incremento significativo de Glu se determinó a las 24 h, la producción de este aminoácido está relacionada con el crecimiento de *L.*

Resultados y Discusión

plantarum y también la glucosa incrementó significativamente la producción de Glu (Zareian y col. 2012). Después de 24 h de FAL, la concentración de Glu disminuyó significativamente, una explicación probable puede ser el sistema glutamato decarboxilasa, el cual está involucrado en la tolerancia al ácido de diversos géneros de bacterias, incluyendo al de *L. plantarum* (Feehily y col. 2013).

En esta sección se puede concluir que se ha determinado electroforéticamente el peso molecular de las proteínas presentes la FAL y que la concentración de aminoácidos relacionados con la actividad antirradicalaria (Val, Ile, Leu, Phe, Met, Pro, Tyr and His) presentó un máximo a partir de las 72 h debido al incremento de la hidrólisis proteica. En este tiempo de fermentación se obtuvo la concentración más baja de hidrolizados proteicos capaces de inhibir al radical en un 50% de su actividad, a cual fue de 5.75 µg proteína/mg.

Resultados y Discusión

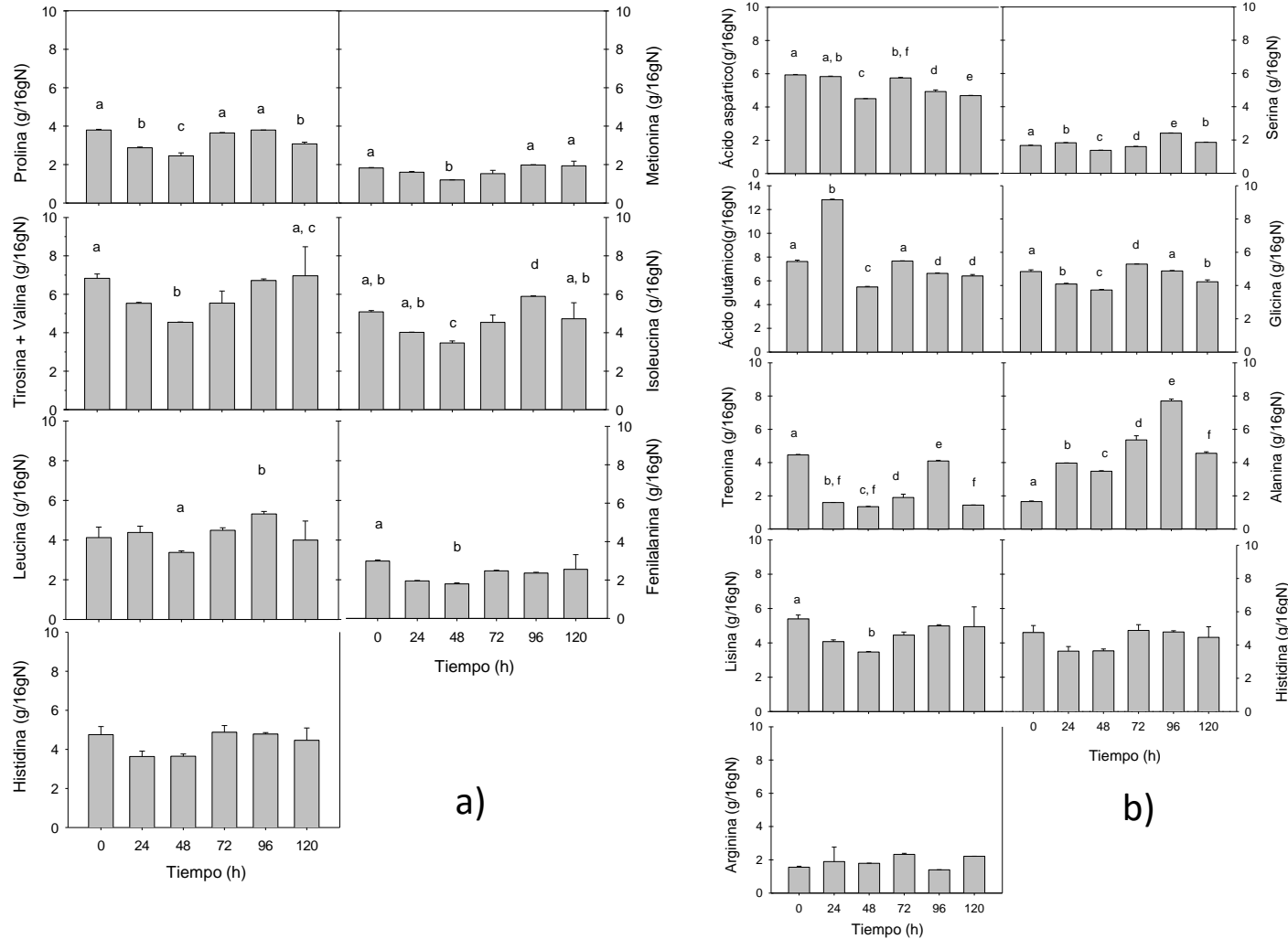


Figura 18. Concentración de aminoácidos en la fermentación láctica de desperdicios de atún con papaya y melaza como fuente de carbono. La concentración de aminoácidos relacionados con la AAR de las muestras de la FAL se muestran en a), los demás aminoácidos se muestran en b). ($p < 0.05$).

7.10 Purificación de péptidos con AAR

Se realizó una purificación de las proteínas y péptidos solubles en agua de la muestra de la FAL a las 72h. A cada fracción obtenida se le determinó la AAR, realizando una prueba de Tukey con el 95% de confianza. Se determinó que la fracción con la mayor actividad es la 3, siendo significativamente diferente a las demás fracciones. Tomando en cuenta este dato y observando que existen otros dos péptidos en la fracción 3 con peso molecular de 17.8, 15.7 y 10.54 kDa (Fig. 19). Para obtener una separación más eficiente de los péptidos encontrados en esta fracción se sometió a otra separación con una columna de intercambio aniónico débil, la cual se muestra en la Figura 20. Separación de la fracción 3 mostrada en la Figura 19. Separación de fracciones proteicas mediante cromatografía de exclusión molecular con Biogel P4 de t=72h de la FAL con el electroferograma de los péptidos encontrados en las fracciones.19 mediante cromatografía de filtración en gel Sepharose DEAE FF con interacción aniónica débil, determinación de la AAR En este proceso se obtuvieron dos fracciones que no muestran diferencias significativas en la AAR. Se tomó la fracción 2, la cual presenta un pico con una mejor resolución y con una AAR superior a la fracción 4. Se sometió a una electroforesis en la que se encuentra una banda con un peso molecular cercano a los 15 kDa, la cual fue cortada para la secuenciación de los aminoácidos presentes en ese péptido.

Resultados y discusión

Fracción	1	2	3	4	5	6	7
%AAR	4.16	5.64	7.64	6.69	3.32	4.58	4.53
D.E.	0.18	0.32	1.43	0.64	0.09	1.12	1.11
p= 0.00028	a		b	c	a	d	d

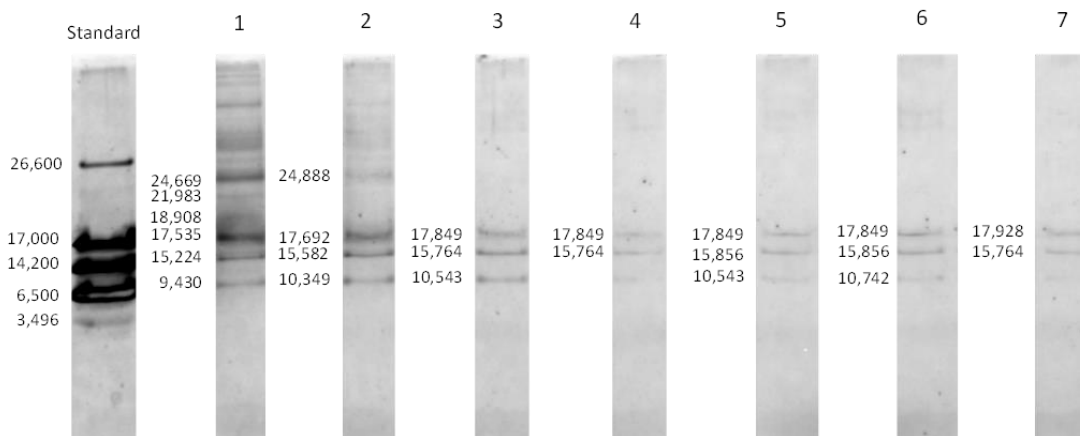
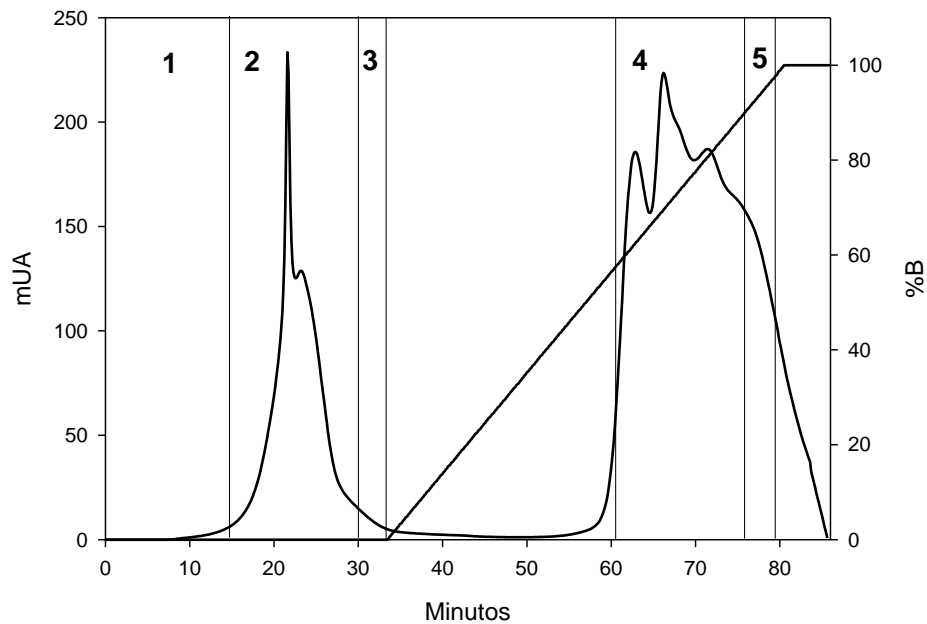


Figura 19. Separación de fracciones proteicas mediante cromatografía de exclusión molecular con Biogel P4 de t=72h de la FAL con el electroferograma de los péptidos encontrados en las fracciones.



Fracción	2	4
%AAR	4.64	3.90
SD	0.46	1.21
P=0.3739		

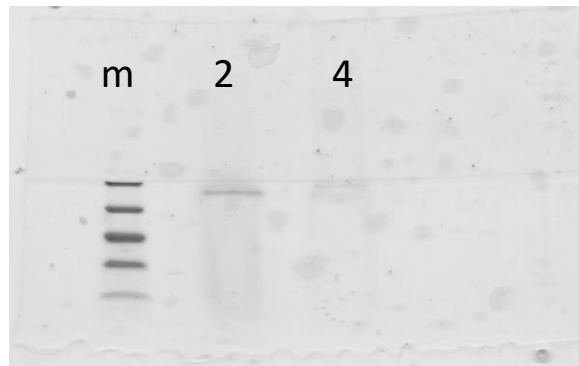


Figura 20. Separación de la fracción 3 mostrada en la Figura 19. Separación de fracciones proteicas mediante cromatografía de exclusión molecular con Biogel P4 de t=72h de la FAL con el electroferograma de los péptidos encontrados en las fracciones.19 mediante cromatografía de filtración en gel Sepharose DEAE FF con interacción aniónica débil, determinación de la AAR y electroferograma de las fracciones.

Resultados y discusión

Para realizar la secuenciación del péptido con mayor AAR se cortó la banda del gel con las muestras obtenidas en la separación de la columna de intercambio aniónico débil. En la tabla 4 se muestran los fragmentos del péptido obtenido a partir de la hidrólisis con tripsina de la proteína contenida en la banda del gel. Se considera por igual a los aminoácidos isobáricos leucina (L) e isoleucina (I) al tener una masa idéntica, sin embargo no se puede confiar en los fragmentos con menos de 9 aminoácidos y con más de 2 L/I para una búsqueda de identidad de secuencia, como es el caso de los fragmentos 2 y 5. En otros fragmentos hay al menos un residuo de L/I. Estos aminoácidos son hidrofóbicos. Otro aminoácido hidrofóbico que se encuentra de manera frecuente en las fracciones es la valina (V), y la fenilalanina (F), un aminoácido aromático. Debido a que los aminoácidos mencionados anteriormente son abundantes en todos los residuos, se puede observar el carácter hidrofóbico de estos. El ácido glutámico (E) se encuentra al menos una vez en todos los residuos y en el caso del 2 contiene ácido aspártico (D), este hecho explica que estas fracciones puedan disolverse en solución amortiguadora de acetatos o en la FAL, ya que el pKa de estos aminoácidos es cercano a 4. La tripsina es una proteasa que realiza la hidrólisis donde se encuentre una lisina (R) o una arginina (K), en los únicos fragmentos en los que se encuentran estos aminoácidos en el sitio terminal es en el 4 y el 6. No se encuentra histidina (H) en ninguno de los fragmentos, por lo que se puede descartar la AAR debida a este aminoácido en los péptidos. A pesar de que esos fragmentos no presentan homología con alguna proteína al ser comparados con la base de datos de BLAST o Uniprot en una búsqueda generalizada o en búsquedas acotadas a las especies de la materia prima de la fermentación, presentan características para poder tener AAR, respecto a su hidrofobicidad.

Tabla 4. Secuenciación del péptido obtenido del fraccionamiento de proteínas de la FAL en el t=72h.

	<i>m/z</i>	<i>Ion</i>	<i>Masa</i>	<i>Secuencia</i>
1	1106.57	2	2211.14	NLDVLEGNEVLV
2	958.48	3	2872.44	NNLLQTLD
3	786.73	3	2357.19	YEFSQDLE
4	751.90	2	1501.80	SSTPLNSFLFK
5	742.40	3	2224.20	LLEMELESLT
6	692.91	2	1383.82	EQNFASFLDK
7	632.81	2	1263.62	LEGEGSSGM

Resultados y discusión

En el caso del radical DPPH, se puede observar su estructura tridimensional en la Figura 21. Estructura tridimensional del radical DPPH (Xie y Schaich, 2015). Los átomos que lo constituyen son el oxígeno (rojo), nitrógeno (azul), carbono (gris) e hidrógeno (blanco). La vista es aproximadamente perpendicular al plano definido por los átomos de nitrógeno del grupo hidracil y el carbono 1 del grupo picril (p). El sitio del radical (N^\bullet) es protegido por los grupos nitro orientados por encima y por debajo de él, así como por un átomo de hidrógeno en la posición orto en cada uno de los anillos de fenilo (A y B), con una posición rotada de los anillos para crear una jaula alrededor del N^\bullet .

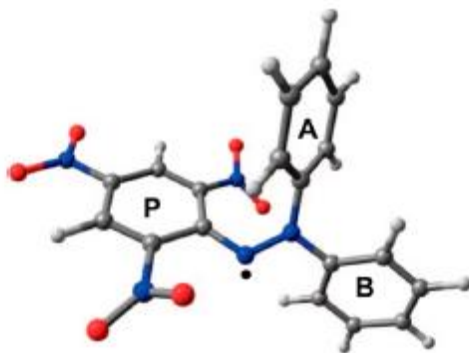


Figura 21. Estructura tridimensional del radical DPPH (Xie y Schaich, 2015).

De esta manera, existe un impedimento estérico considerable para que alguna molécula grande pueda reaccionar de manera rápida con el radical, es por esa razón que las reacciones de moléculas pequeñas como los polifenoles ocurren de una manera rápida.

En el caso de los péptidos, pueden existir grupos funcionales en los aminoácidos capaces de donar un protón, como la tirosina y la histidina, de los cuales no existe más que un residuo del primero en el fragmento 3 de la secuencia.

Resultados y discusión

Dicho esto, el mecanismo que se propone para que pueda llevarse a cabo la neutralización del radical DPPH es mediante la interacción de los grupos hidrofóbicos de los aminoácidos de los péptidos rodeando al radical, existen reportes de que la actividad de los péptidos contra los radicales libres reside en la presencia de aminoácidos hidrofóbicos en la secuencia, no sólo en los que son de origen animal, como los de pescado (Senevirathne y Kim, 2012) o del huevo (Nimalarante y *col.* 2015), sino también en péptidos de origen vegetal (Chen y *col.* 1998, Chen y *col.* 2012). La manera en la que sucede es la capacidad de impedir que el N[•] quede expuesto, susceptible de reaccionar, por lo que los grupos capaces de transferir un hidrógeno o un electrón ya sean de origen proteico o no compiten por el sitio con una serie de péptidos con presencia de aminoácidos mayormente hidrofóbicos. Esto causa que la reacción no sea inmediata sino sostenida por un lapso de tiempo mayor al de la reacción, en el caso de radicales libres con un impedimento estérico, como el caso del DPPH y el ABTS, que con otro tipo de radicales puede llegar a ser menor esa limitante. Además, el hecho de que existan distintos mecanismos de reacción para neutralizar al radical DPPH no relaciona directamente a la actividad de un péptido con la de una curva patrón de un compuesto fenólico como es el caso del Trolox, del ácido gálico o de compuestos como el ácido ascórbico, sólo por citar algunos ejemplos.

7.11 Determinación de peso molecular por cromatografía de exclusión y purificación de péptidos

Se elaboró una curva con estándares de peso molecular de la separación de proteínas por exclusión molecular. Debido a que la columna con Sephacryl S-100 tiene una resolución óptima para proteínas de peso molecular menor a 100 kDa y el estándar comercial utilizado no incluía suficientes proteínas de bajo peso molecular para el ajuste, se añadió insulina comercial de acción

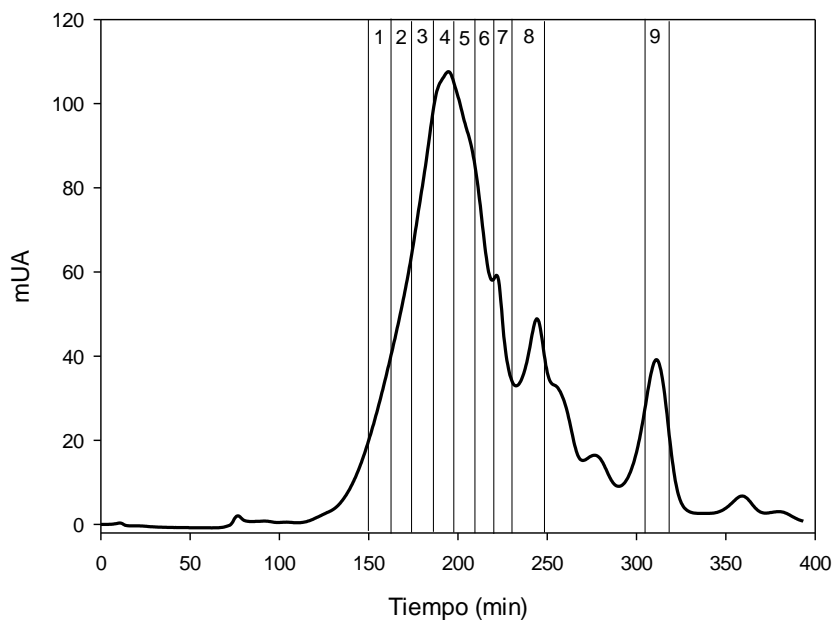
Resultados y discusión

rápida como estándar para poder determinar el peso molecular de las fracciones obtenidas. Dicha curva de estándares se muestra en la Figura 1. Separación de estándar de proteínas mediante cromatografía de exclusión molecular con una columna Sephacryl S-100. No se recomienda utilizar como estándar otros tipos de insulinas de acción intermedia o lenta debido a que esta insulina se comercializa interactuando con proteínas como la protamina para lograr el efecto retardante y esto interfiere de manera desfavorable en la elaboración de la curva.

Se realizó una separación cromatográfica del inicio de la fermentación ($t=0h$) que se muestra en la figura 22 y el tiempo con máxima AAR ($t=72h$) en la Figura 23. Separación de fracciones proteicas mediante cromatografía de exclusión molecular con Sephacryl S-100 de $t=72h$ de la FAL, con el tiempo de retención, el porcentaje de AAR y el peso molecular de acuerdo con el estándar. con el objetivo de constatar los cambios en la distribución de proteínas. Se puede observar que no existe un cambio más que en la aparición del pico de la fracción 5 y el aumento de área del pico de la fracción 9 de la Figura 23. Separación de fracciones proteicas mediante cromatografía de exclusión molecular con Sephacryl S-100 de $t=72h$ de la FAL, con el tiempo de retención, el porcentaje de AAR y el peso molecular de acuerdo con el estándar. Los pesos moleculares corresponden a 13 y 3.48 kDa respectivamente y en el caso de la fracción 9 se separaron los compuestos sin ser pasados por una columna de intercambio iónico y fueron inyectados directamente a una columna C18 de HPLC, este cromatograma se observa en la Figura 24. Separación de fracciones proteicas mediante HPLC de fase reversa de la fracción 10 de $t=72h$ de la FAL. La fracción 5 es susceptible de ser identificada mediante espectroscopía de masas y la fracción 9 es susceptible de evaluar su actividad antihipertensiva e identificar su secuencia.

Resultados y discusión

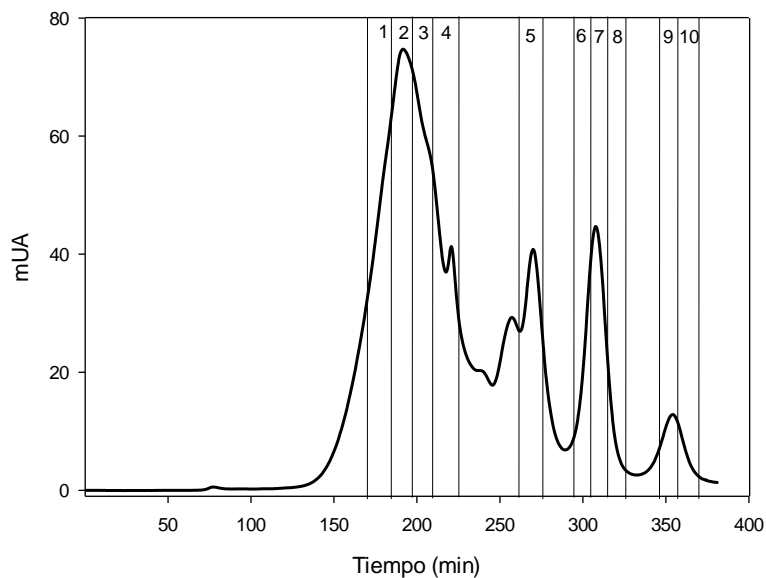
Por lo tanto, se puede concluir que la purificación de péptidos muestra fragmentos con una alta concentración de aminoácidos hidrofóbicos, que están relacionados con la actividad contra radicales libres.



0h	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tr (min)	160	170.24	180.91	194.56	204.37	214.61	221.44	244.05	311.04
% RS	13.06	35.69	30.55	52.38	63.07	36.46	16.47	8.11	2.53
±	3.26	3.08	1.64	1.73	3.09	1.17	1.49	2.78	3.39
PM (KDa)	72.48	61.74	52.24	42.19	36.18	30.82	27.70	19.44	6.81

Figura 22. Separación de fracciones proteicas mediante cromatografía de exclusión molecular con Sephacryl S-100 de t=0h de la FAL, con el tiempo de retención, el porcentaje de AAR y el peso molecular de acuerdo con el estándar.

Resultados y discusión



72h	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tr (min)	175.2	191.6	205.6	220.8	270	300	307.6	319.6	354	360
%AAR	22.24	36.83	30.21	34.01	13.93	7.96	12.26	8.30	10.21	10.45
±	4.73	1.16	1.37	11.20	2.68	1.97	3.63	3.56	1.78	3.55
PM (Kda)	57.13	44.19	35.49	27.97	12.95	8.09	7.19	5.96	3.48	3.16

Figura 23. Separación de fracciones proteicas mediante cromatografía de exclusión molecular con Sephacryl S-100 de t=72h de la FAL, con el tiempo de retención, el porcentaje de AAR y el peso molecular de acuerdo con el estándar.

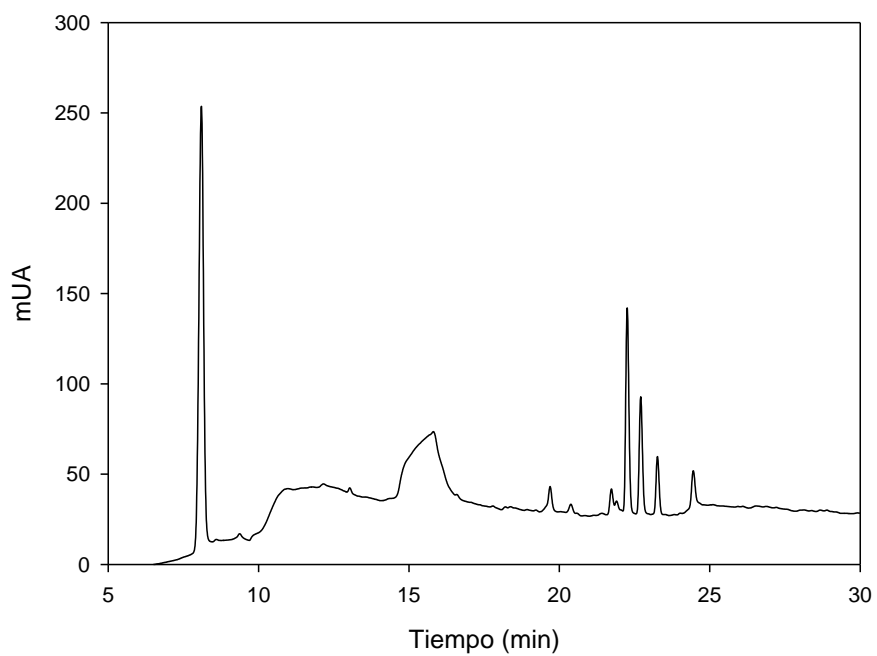


Figura 24. Separación de fracciones proteicas mediante HPLC de fase reversa de la fracción 10 de t=72h de la FAL.

8. Conclusiones.

- Se caracterizó el producto de la fermentación láctica de residuos pesqueros y agrícolas, el cual ha resultado estable y con un alto grado de hidrólisis y digestibilidad.
- Se ha determinado electroforéticamente el peso molecular de las proteínas presentes en la FAL a lo largo de todo el tiempo de la fermentación.
- Se determinó el consumo de azúcares, los cuales se relacionan directamente con la producción de ácido láctico (AL). La concentración máxima de AL generado, la constante de la tasa de acidificación y la tasa de máxima producción de ácido láctico se estimaron con el modelo de Gompertz con datos de 5 días (120h) de fermentación y éstos fueron de 1.27 mmol AL/g, 0.142 h⁻¹ y 0.067 mmol AL/gh, respectivamente.
- El grado más alto de hidrólisis proteica fue de 87.71% y fue alcanzado a las 120 h de fermentación.
- La concentración de aminoácidos relacionados con la actividad antirradicalaria (Val, Ile, Leu, Phe, Met, Pro, Tyr and His) presentó un máximo a partir de las 72 h debido al incremento de la hidrólisis proteica. En este tiempo de fermentación se obtuvo la concentración más baja de hidrolizados proteicos capaces de inhibir al radical en un 50% de su actividad, a cual fue de 5.75 µg proteína/mg.
- La purificación de péptidos muestra fragmentos con una alta concentración de aminoácidos hidrofóbicos, que están relacionados con la actividad contra radicales libres
- El procesamiento de subproductos de atún mediante la metodología propuesta resulta ser una fuente de hidrolizados proteicos de alto valor agregado debido a su actividad contra radicales libres, la estabilidad del proceso, el alto grado de hidrólisis y digestibilidad, así como la inocuidad al no encontrarse la presencia de coliformes.

9. Perspectivas

- Secuenciación de otras proteínas y péptidos purificados
- Determinación de otras actividades biológicas
- Determinación de actividad antimicrobiana
- Evaluación como aditivo para evitar la rancidez
- Evaluación como ingrediente en dietas de animales o en la formulación de medios de cultivo microbianos.

10. Artículo publicado

Vol. 15, No. 1 (2016) 91-100



Revista Mexicana de Ingeniería Química



PAPAYA (*Carica papaya*) AND TUNA (*Thunnus albacares*) BY-PRODUCTS FERMENTATION AS BIOMANUFACTURING APPROACH TOWARDS ANTIOXIDANT PROTEIN HYDROLYSATES

FERMENTACIÓN DE PAPAYA (*Carica papaya*) Y SUBPRODUCTOS DE ATÚN (*Thunnus albacares*) PARA LA BIOFABRICACIÓN DE HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

M.P. Carballo-Sánchez¹, J.C. Ramírez-Ramírez², M. Gimeno³, G.M. Hall⁴, M.G. Ríos-Durán⁵, K. Shirai^{1*}

¹ Universidad Autónoma Metropolitana, Biotechnology Department, Laboratory of Biopolymers and Pilot Plant of Bioprocessing of Agro-Industrial and Food By-Products, Av. San Rafael Atlixco No. 186. Col. Vicentina, C.P. 09340. Iztapalapa, Mexico City.

² Universidad Autónoma de Nayarit Ciudad de la Cultura Amado Nervo, C.P. 63155 Tepic, Nayarit, México.

³ UNAM, Depto. de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, C.P. 04510, Mexico City.

⁴ University of Central Lancashire, Centre for Sustainable Development PR1 2HE United Kingdom

⁵ Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. San Juanito Itzcuaró S/N. Unidad San Juanito. C.P. 58330 México

Received October 12, 2015; Accepted February 8, 2016

Abstract

The efficient production of lactic acid, standardization of ingredients, protein hydrolysis, and the presence of an active starter were key factors for development of a controlled lactic acid fermentation of fish wastes and papaya. The maxima buffering capacities, proteases activities, protein and ash contents were considered for the selection of the suitable mixture of bones, fins, viscera, heads and dark meat. In addition, the overproduction of papaya is commonly presented in tropical countries, and herein, papaya surpluses were successfully employed as carbon source for *Lactobacillus plantarum* fermentation of tuna toward the production of added value protein hydrolysates. The maximum lactic acid produced, acidification rate constant and maximum acid production rate were estimated by Gompertz model with experimental data of 5 d of 1.27 mmol of lactic acid/g, 0.142 1/h and 0.067 mmol LA/gh, respectively. The highest degree of hydrolysis of 87.71% was achieved at 120 h. The radical-scavenging activity of the protein hydrolysates was determined by electron paramagnetic resonance spectroscopy analyses based on the conversion of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free-radical. In addition, the lowest concentration of tuna protein hydrolysates (5.75 µg protein/mg) that gave the half-maximal inhibitory concentration was determined at 72 h of fermentation.

Keywords: *Thunnus albacares*, radical scavenging, biorefinery, protein hydrolysate, *Carica papaya*.

Resumen

La producción eficiente de ácido láctico, estandarización de los ingredientes, hidrólisis de proteínas, así como la presencia de un cultivo iniciador activo fueron factores claves para el desarrollo de una fermentación ácido láctica controlada. El contenido de proteínas, cenizas, enzimas proteolíticas y la capacidad amortiguadora del sustrato fueron empleados como criterios para la selección de la mezcla de cabezas, huesos, vísceras y carne negra de atún (*Thunnus albacares*). Otro subproducto empleado en este trabajo fue papaya (*Carica papaya*), la cual comúnmente presenta excedentes de producción. La concentración máxima de ácido láctico producido, la tasa de acidificación y la velocidad máxima de producción fueron estimadas mediante modelo de Gompertz en 1.27 mmol de ácido láctico/g, 0.142 1/h y 0.067 mmol de ácido láctico /gh, respectivamente. El grado de hidrólisis más alto determinado a las 120 h fue de 87.71%. La actividad antiradicalaria en los hidrolizados de proteínas fue determinada mediante estudios de espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica, basado en la inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil. La concentración más baja de hidrolizado proteico que produjo el 50% de actividad antiradicalaria, IC₅₀, fue de 5.75 µg de proteína/g determinada a las 72 h de fermentación.

Palabras clave: *Thunnus albacares*, antioxidante, capacidad antiradicalaria, hidrolizados proteicos, *Carica papaya*.

* Corresponding author. E-mail: smk@xanum.uam.mx
Tel: +(52) 5558044921; Fax: +(52) 5558044712

1 Introduction

Tuna species (*Thunnus albacares*) are extensively processed worldwide giving rise to a large amount of unused by-products. These by-products are composed of viscera, skin, gills, head, bones and dark meat. Despite good nutritional characteristics, dark or red meat have no commercial value due to their unpleasant taste (Graham and Dickson 2004). Several methods have been reported to draw on these by-products; some are based on chemical hydrolysis, regardless of poor final product quality, and others by biological means including hydrolysis by exogenous or endogenous enzymes in mild process conditions (Pihlanto and Korhonen 2003; Chi *et al.*, 2015; Reyes-Méndez *et al.*, 2015). These bio-based methodologies offer ease of control of the reaction and optimal recovery of added-value products without side products (Shirai and Ramirez-Ramirez 2011). Among them, lactic acid fermentation (LAF) proved successful owing to process stability, inhibition of undesirable bacterial growth and the production of biopolymers, valued organic acids and hydrolysates in a GRAS and chemical-free process with low energy requirement (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2008; Flores-Albino *et al.*, 2012). These fermentations are widely used to process small pelagic fish or fish by-products, e.g. sauce production in heavily salted conditions. In this regard, some mechanisms have been put forth to describe antioxidant activities of peptides, including ion-chelating capacity, radical scavenging and aldehyde adduction (Mishra *et al.*, 2011). The feed for the lactic acid bacteria (LAB) covers a wide range of substrates; nonetheless the papaya (*Carica papaya*) is pointed out due to its high protease content and additionally, it is intensively cultivated throughout the year in tropical countries owing to its high demand as fresh fruit and ingredient in food processing (Fabi *et al.*, 2007). On the other hand, the lactic acid (LA) produced in situ has a significant role in fish conservation and antimicrobial effect against undesirable microflora. Generally, the efficacy of LAF is based on the rate of pH drop and its final value, which rely on water activity, temperature and process time, activity of starter and buffer capacity. Practical utilization of fish by-products by biotechnological means requires information on the buffer capacity, endogenous protease activities, and ash and protein contents. In this regard, the bioactive peptide production from tuna wastes by LAF with papaya and molasses as carbon sources has not been reported to the best of our knowledge and the present

work establishes the conditions for efficient bioprocess production of antioxidant protein hydrolysates.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Lactobacillus plantarum (APG-Eurozym) was cultivated in Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar at 30 °C and kept at 8 °C prior to use. Inoculum was prepared in MRS broth by inoculation from the bacterial slants and incubated at 30 °C for 24 h to reach a cell count of 10⁸ colony-forming units per millilitre (CFU/mL). Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes were obtained from a canned tuna processing plant in Mazatlan (Sinaloa State, Mexico). The wastes consisted of three factions: i) fresh viscera (V), ii) heads, bones and fins (HBF) and iii) dark meat (DM). The fish were manually gutted and abdominal cavity was washed with water. Eviscerated fish was steam cooked at 100 °C for 3 h. HBF and DM were separated from fish. Each fraction was minced separately through a 5 mm sieve using a meat mincer (Torrey 32-3, Mexico) and stored at -20 °C. Sugar cane molasses were supplied by sugar mill "El Molino S.A. de C.V." in Nayarit state (Mexico). Papaya fruit (*Carica papaya* L. var Maradol) at commercial maturity (skin yellowed and orange soft pulp) was harvested in the state of Veracruz (Mexico) and milled in a blender prior to use. Soluble sugars in molasses and papaya were determined by the method of phenol sulphuric acid (Dubois *et al* 1956). Reagents 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), acrylamide, bisacrylamide, sodium dodecyl sulphate, Tris base, Tricine, glycerol and ultra-low molecular weight marker (1060-26600 Da) were supplied by Sigma-Aldrich (USA). Electrophoresis grade Coomassie Blue G-250, 2-mercaptoethanol and TEMED were supplied by Bio-Rad (USA).

2.2 Determination of tuna wastes proportions in the mixture, starter level and papaya concentration for LAF

Tuna wastes in LAF varied upon the ratio of V and HBF (wt/wt%): 64.9:7.2; 43.8:28.3; 33.3:39.3; 14.4:42.3; 7.2: 64.9. DM was kept at 27.9 wt/wt% considering that this fraction presented the highest protein content. Mixtures were analyzed on their proteases activities (Bougatef *et al.*, 2009) and ash content (AOAC 1997). Five grams of tuna waste

mixtures were homogenized in 50 ml of deionized water. Homogenates were equilibrated at 25°C and stirred continuously during titrations with LA (0.054N) employing pH meter equipped with a glass electrode (pH 210 HANNA, Italy). Maximum buffer capacity (β_{\max}) was estimated as the slope of pH-neutralization curves in the immediate vicinity of pKa value (pKa of LA=3.86) according to equation 1 (Baicu and Taylor, 2002).

$$\frac{dV}{d\text{pH}} = \beta_{\max} = \left| \frac{a}{4b} \right| = \left| \frac{(y_2 - y_1)}{(x_2 - x_1)} \right| \quad (1)$$

dV is expressed in mmol/l, β_{\max} in slykes (mmol of LA required to titrate the pH of 1 g (wet wt) of tuna mixture by one pH unit). The first derivative $f(X_0) = |a/4b|$ is the slope of the tangent to the titration curve at pKa location. Limits of linearity are $(y_2 - y_1)$ and $(x_2 - x_1)$ of the pH-LA volume curve. Tangent and linear portion of the curve were overlapped and their slopes coincided.

The starter level was determined using 10 (wt/wt%) sugar cane molasses to the selected tuna wastes mixture and inoculated with 5, 10 or 20 (v/wt% wet basis) of *L. plantarum* at 30 °C. The integrated Gompertz model was applied to analyze the kinetic data of LA production as function of time t according to the equation 2:

$$P = P_{\max} \exp(-b \exp(-kt)) \quad (2)$$

where P_{\max} is the maximum LA produced ($t \rightarrow \infty$), b is a constant related to the initial conditions (when $t = 0$, then $P = P_{\max} \exp(-b)$) and k is the acidification rate constant. Kinetic constants P_{\max} , b and k were estimated by the non-linear estimation programme STATISTICA (StatSoft, Inc.). Maximum acid production rate (V_{\max}) was calculated from parameters of the Gompertz model as $V_{\max} = 0.368kP_{\max}$.

After the establishment of selected ratio of tuna wastes and inoculation level, several papaya concentrations (10, 20, 30 and 50 wt/wt%) were evaluated with 5 (wt/wt%) starter at 30 °C. Samples were withdrawn for analyses every 24 h and up to 120 h.

2.3 LAF in packed bed column reactor

LAF was conducted in a stainless steel column reactor placed in controlled temperature chamber (30 °C) and filled with 4 kg of the tuna wastes, 5 (v/wt%) of inoculum, 10 (wt/wt%) of molasses and 30 (wt/wt%)

of papaya. After mixing, samples (200 g) were taken from the reactor every 24 h and up to 120 h for analyses. LAF samples were mixed in a 1:10 dilution with deionized water, homogenized at 3200 rpm for 2 min in an Ultraturrax ® T 25 homogenizer (IKA, Germany) and then centrifuged for 10 min at 15,000 g (4 °C). The pellet was discarded and the supernatant was filtered throughout 22 μm pore cellulose filter (Columbia Filter, Mexico).

2.4 Determination of pH, total titratable acidity, sugars and organic acids

The pH of samples was measured in a pH meter equipped with a glass electrode (pH 210 HANNA, Italy). Samples were diluted in distilled water (1:10) and total titratable acidity (TTA) was determined by titration with sodium hydroxide (0.1N) until a final pH of 7.5 and expressed as mmol of LA/g (Fabi *et al.*, 2007). Sugars and organic acid were determined by HPLC according to the following methodology: samples were diluted with distilled water (1:10) and then homogenized by centrifugation for 20 min at 15,000 g (4 °C). Supernatants were analyzed in an Agilent 1260 chromatographer (USA) equipped with a refractive index detector and an Aminex® column (BioRad) using H₂SO₄ solution (5 mM) as mobile phase at 40 °C. Sucrose, glucose, fructose, LA and acetic acid concentrations were determined according to standard concentration curves.

2.5 Determination of degree of hydrolysis (DH) in protein hydrolysates

α -Amino acid contents were determined by the modified method of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2008) using known concentrations of *L*-leucine and expressed as mM of α -amino acids. Percentage DH was calculated using the equation 3.

$$\text{DH} = \frac{[(\text{NH}_2)_{t_x} - (\text{NH}_2)_{t_0}]}{[(\text{NH}_2)_{HT} - (\text{NH}_2)_{t_0}]} \times 100 \quad (3)$$

where: $(\text{NH}_2)_{t_x}$ is the amount of terminal α -amino groups released at the time of fermentation t_x ; $(\text{NH}_2)_{t_0}$ is the amount of terminal α -amino groups released at the time of fermentation t_0 ; $(\text{NH}_2)_{HT}$ is the amount of terminal α -amino groups without fermenting obtained after acid hydrolysis.

2.6 Microbiological analysis

Decimal dilutions in 0.9 (wt/v%) of sterile NaCl solution were prepared from samples in order to determine viable cell count in MRS and brilliant green bile (BD Bioxon, Mexico) agar plates for LAB and enterobacteria, respectively.

2.7 Determination of proteolytic activities

Activities of acidic and neutral proteases were determined employing hemoglobin and casein as substrates, respectively. Hemoglobin was dissolved in universal buffer (0.05 M) at pH 5 (Anson, 1938) and casein solution was prepared in phosphate buffer at pH 7 (Kunitz, 1947). A supernatant volume of 150 μ L of was added to 1 mL of substrate (1 wt/v%) in its respective buffer and incubated for 1 h at 35 °C. The reaction was quenched by the addition of 1 mL of trichloroacetic acid (5 wt/v%), centrifuged and the supernatant absorbance measured at 280 nm. One unit of enzymatic activity (U) was defined as the amount of enzyme that produces an increment of 0.001 of absorbance units per min under the assay conditions.

2.8 Determination of radical scavenging activity (RSA)

Protein hydrolysate sample solutions were prepared and RSA were determined for electron scavenging activity using an Elexys Super X $\text{\textcircled{R}}$ EPR spectrometer (Bruker, Germany) under the following procedure: different protein concentrations (20-1000 μ g soluble protein/mg) were prepared in test tubes to which 2 mL of freshly prepared 0.1mM DPPH in methanol were added. Tubes were stirred in a vortex and incubated at 30 °C for 30 min in darkness. Then, sample was placed in a quartz flat cell to measure under 4 averaged scans, 100 kHz field modulation frequency, 9.78 GHz microwave frequency and 5 mW microwave power. Scavenging activity was calculated according to equation 4.

$$\text{RSA} = \left(\frac{1 - H_x}{H_0} \right) \times 100 \quad (4)$$

where H_x and H_0 were the height on the spectra of the third resonance peak for samples with and without protein, respectively. RSA determinations were carried out by triplicate. Experimental data were fitted to Probit statistical analysis in NCSS $\text{\textcircled{R}}$ programme (NCSS LLC. USA). IC_{50} value was the concentration of protein hydrolysates that inhibit 50%

of DPPH radical scavenging activity (Bougatef et al., 2010).

2.9 Determination of molecular weight of protein hydrolysates by SDS-PAGE

LAF sample was suspended in 5 mL of acetic acid solution (0.087M) prior to injection in a Sep-Pak C-18 $\text{\textcircled{R}}$ cartridge (Waters, USA) eluted with 5 mL acetonitrile solution (50%). Eluted samples were freeze dried and dissolved in buffer (12% SDS, 6% mercaptoethanol, 30% glycerol, 0.05% Coomassie blue G and 150mM TRIS HCl pH 7.0) and analyzed by denaturing electrophoresis SDS-PAGE. Gels were stained with coomassie blue (Bio-Rad, USA) and analyzed with the image processing software (ImageJ 1.41o National Institutes of Health, USA).

3 Results and discussion

3.1 Selection of dark meat:viscera:heads, bones and fins (DM:V:HBF) ratios in mixture of Tuna wastes for lactic acid fermentation

The proportion of fish waste fractions was determined upon protein, ash contents, buffer capacity and protease activity in the mixtures. The ash content increased consistently with the HFB (Figure 1), which might lead to raising the buffer capacity in fish fractions. Nevertheless, the highest buffer capacity was estimated in the mixture of 27.9:33.3:39.3 of DM:V:HBF, which also contained high protein content, 84.24 ± 2.96 % slykes. In this regard, DM presented the highest protein content ($50.06 \pm 1.12\%$) followed by V ($46.22 \pm 0.55\%$) and HBF ($27.82 \pm 0.52\%$) (See supporting information 1 for maxima buffer capacities (?max) for mixture of Tuna wastes). The DM is a characteristic fish tissue that contains high myoglobin content, which has buffering capacity and, it enhances the diving capacity in marine animals against the accumulation of LA produced by muscle buffering under hypoxic conditions. Adequate buffering capacity is required since fast acidification during LAF can inhibit starter growth and negatively affect protease activity; however, highly-buffered substrate might slow down the pH decrease thereby favoring the development of spoilage microorganisms (Figure 1). Góngora and co-workers (2012) reported that *Lactobacillus plantarum* was able to reduce the pH to 4 in fish silage, however it presented inhibition

Table 1. Kinetic constants of lactic acid in Tuna by-products with added 10(wt/wt%) of molasses fermentation for production of protein hydrolysates with *Lactobacillus plantarum* as inoculum.

Papaya (wt/wt%)	Inoculum level (v/wt%)	P_{max} (mmol/g)	K (h^{-1})	V_{max} (mmol/gh)	R^2	pH
0	5	0.344	0.115	0.015	0.98	4.88 ± 0.03^a
0	10	0.429	0.163	0.026	0.97	4.72 ± 0.05^a
0	20	0.526	0.220	0.043	0.95	4.49 ± 0.03^c
30	5	1.263	0.142	0.066	0.99	4.62 ± 0.03^b

Values with different superscript letters in the same column showed significant differences ($p \leq 0.05$) according to Tukey-Kramer multiple comparison test.

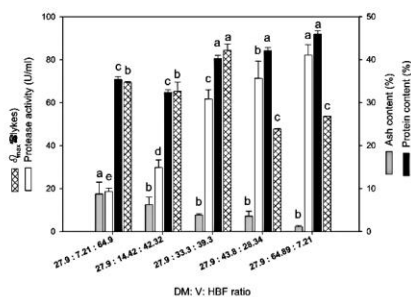


Fig. 1. Criteria employed for the selection of dark meat:viscera:heads, bones and fins (DM:V:HBF) ratios in mixture of tuna wastes for lactic acid fermentation expressed as maxima buffer capacities (β_{max}), proteases activities, protein and ash contents.

after 383 min at pH 3 and inability to grow at pH 2. It is noteworthy that DM and HBF samples were previously cooked in the fishery and only V was raw, neutral protease activity was directly related to the amount of this ingredient in the mixture. The level of endogenous enzymes in the mixture with V of 33.3 wt/wt% was statistically grouped after those with V ratios of 43.8 and 64.9 wt/wt%, but higher than mixtures with V ratios of 7.21 and 14.42 wt/wt% (Figure 1). Therefore, based on the high buffering capacity and protein content, as well as active neutral digestive proteases the mixture of tuna wastes with 27.9 wt/wt% of DM, 33.3 wt/wt% of V and 39.3 wt/wt% of HBF was selected for further experimentation.

3.2 Effect of inoculum level and papaya concentration on acidification in LAF

LA production (TTA) in tuna by-products fermentations with 10% of molasses and starter levels

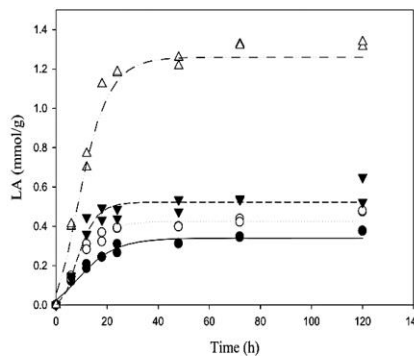


Fig. 2. Profile of acid production for fermentations and their adjustment to the Gompertz model with 10 (wt/wt%) molasses varying starter level (●) 5, (○) 10, (▼) 20 (v/wt%) and with 5 (wt/wt%) of inoculum and (Δ) with added 30 (wt/wt%) of papaya.

are shown in Figure 2. LA production presented significant differences ($\alpha < 0.95$) at all tested levels of inoculum. The P_{max} and V_{max} increased with inoculation level, especially at 20%, whereas at 5% and 10% the acidification rate (k) increment was not significant, as well as pH after 120 h of fermentation. Therefore, 5 v/wt% of starter was chosen for further experimentation considering its cost in a scaled up process.

Noteworthy, the ripeness of papaya would not be a constraint when scaling up because the average sugar contents in ripe papaya (43.5 ± 0.39 mg sugars/g) determined in eight samples taken on March and December of 2007, 2012 and 2014 displayed no significant differences among batches, which is in agreement to similar studies by Gómez and co-workers (2002) that determined no significant differences between total soluble sugar of green (38.6

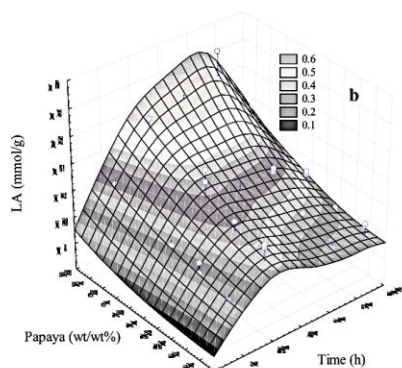


Fig. 3. Graphical 3D representation of time course of LA production of fermentations inoculated with 5 (wt/wt%) of *L. plantarum* and variations on papaya levels.

mg sugars/g), intermediate (43.8 mg sugars/g) and ripe (48.6 mg sugars/g) papaya. Therefore, the commercially disregarded fruits owing to sensory perceptions or low quality standards would be still of use in our LAF system. The papaya concentration and fermentation time had a significant effect on LA as shown in Figure 3. The combination of papaya level and time yielded the largest acid production. According to the results, papaya level increased LA production when time increased. The LAF carried out with 30 or 50 (wt/wt%) of fruit contained enough soluble sugars, however, at low papaya concentrations (10 and 20 wt/wt%), the TTA decreased with time, thus reaching a peak at 24 h that gradually fell toward the end of the fermentation. By contrast, high TTA (>0.6 mmol of LA/g LAF) values were attained in LAF at increased fruit content (Figure 3). The treatment with 50 wt/wt% of papaya displayed a steep decrease in pH and high TTA, although the latter decreased significantly after 96 h, therefore, according to the experimental data, 30 wt/wt% of papaya supplemented with 10 wt/wt% of molasses as carbon source (519.3 ± 64.61 mg sugars/g molasses) ensured a stable acid production throughout fermentation. As shown in Figure 4, treatments with these favoring levels kept the pH near 4.6 with increase in the LA as a consequence of the *Lactobacilli* growth which in turn, might inhibit spoilage microbiota

as well as inhibitors such as hydrogen peroxide and bacteriocins as reported by Todorov *et al.*

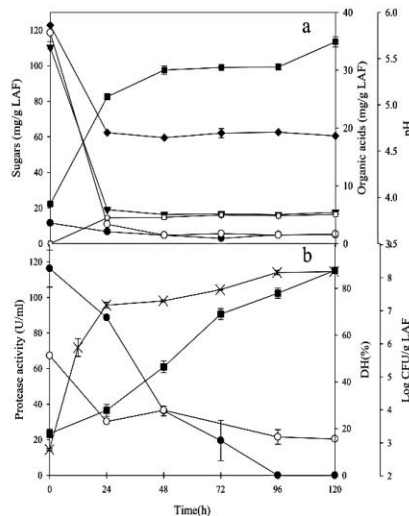


Fig. 4. LAF with papaya (30 wt/wt%) and molasses as carbon sources. Time course determinations of: a) sugars and organic acids determined by HPLC (♦) pH, (●) sucrose, (○) glucose, (▼) fructose, (blacksquare) LA and (□) acetic acid and b) (●) acidic, (○) neutral proteases, (■) DH and (×) lactic acid bacteria enumeration.

(2011). In the present work relatively high sucrose, fructose and glucose consumptions were observed in the first 24 h until reaching a stationary phase (Figure 4). In spite of using a homofermentative starter, acetic acid was also found to a small extent, which might be ascribed to heterofermentative endogenous microflora. Both organic acids displayed inhibitory effect on enterobacteria as it was determined by microbiological analyses, as expected, owing to the thermal pretreatment and the acidic conditions afterwards. The viable cell count of *Lactobacilli* increases throughout the time course of the LAF (Figure 4b) concomitantly with the sugar consumption and LA production (Figure 4a), and additionally, glucose and fructose decreased to low concentrations toward the stationary phase.

3.3 Determination of DH during fermentation

The DH determined during time course of LAF (Figure 4b) reached 89% at 120 h whereas reports of enzymatic protein hydrolysis in fish show lower values (4.7 to 30%), which might be explained by proteolytic activities observed during our LAF (Figure 4b). Acidic protease activity was high when the fermentation started but it decreased to null activity at 96 h. However, neutral protease activity remained throughout the fermentation, which resulted in an increase of DH (Figure 4b). Keeping in mind that protease activities in fish are mostly active from neutral to mild acidic conditions, this observed activity might be ascribed to trypsin-like and chymotrypsin-like digestive enzymes (Sriket, 2014). In spite of the acidic conditions during LAF, the activity of acidic proteases decreased at long reaction times that might be attributed to the cleavage by other proteases such as fish digestion enzymes, papain or microbial proteases. In this regard, pepsins found in tuna viscera might present activities under our LAF conditions in agreement to other studies (Simpson, 2010). The pepsins from marine animals were reported to have relatively higher optimum pH and stability range (pH 2.0-4.0) for hydrolysis than mammalian pepsins with a wide optimal temperature range (37-55 °C) and additionally, the papaya source presented neutral protease activity values of 0.767 ± 0.08 U/mg. According to Skelton (1968), papain from *Carica papaya* displays a temperature range from 25 °C (about 65% of maximal activity) to 70 °C (about 60% of maximal activity) with an optimum at 40 °C. In the present study, the pH ranges from 5 (70% maximal activity) to 8 (85% maximal activity) and the optimum varied from 6 to 6.5. The proteolytic activity from exogenous proteases with *L. plantarum* is reported at pH above 4.0, similar to that in LAF, with viable cell populations from 1.2×10^6 to 2.0×10^6 CFU/mL (Khalid and Marth, 1990), which is lower than the 108 CFU/mL determined in our LAF. This data provides further evidence of the relatively high activity of proteases from papaya and fish by-products. Finally, figure 5 shows the electrophoretic profiles of initial time and LAF samples after 72 h, where high molecular weight proteins (> ca 260 kDa) were not detected but an increase of those with low molecular weights. The SDS-Tricine gels display protein bands below 8.7 kDa for the 96 and 120 h of LAF.

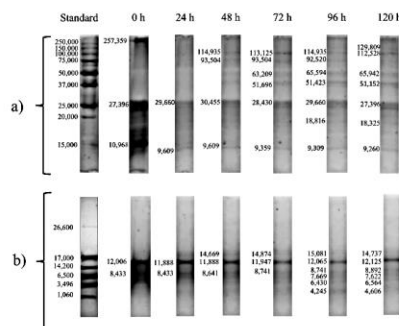


Fig. 5. SDS-PAGE of proteins obtained by LAF using papaya and molasses as carbon sources. Lane 1 molecular weight standard, Lanes 2 and 3 are 0 and 72 h, respectively.

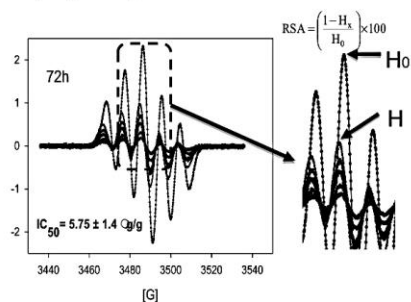


Fig. 6. EPR spectra in the range of concentrations tested for determination of IC_{50} by fitting RSA data to Probit model at 72h, where H_x and H_0 were the heights on the spectra of the third resonance peak for samples with and without protein, respectively.

3.4 RSA of protein hydrolysates

The group with the highest RSA was that from 72 and 96 h with IC_{50} of 5.75 ± 1.04 $\mu\text{g/g}$ and 7.6 ± 1.7 $\mu\text{g/g}$, respectively, however, samples from 24 and 48 h displayed IC_{50} of 10.82 ± 1.9 and 9.06 ± 1.06 $\mu\text{g/g}$, respectively (See Supporting information 2 for EPR spectra in the range of concentrations tested for determination of IC_{50} by fitting RSA data to Probit model). In this regard, inherent proteins, melanoidins and polyphenols in fruit well might explain the observed RSA (IC_{50} of 23.24 ± 1.04 $\mu\text{g/g}$) at the beginning of LAF (Fig. 6b). However, RSA was retrieved by the release of hydrolysates from

protein (Fig. 3c). Je *et al.* (2007) and Bougatef *et al.* (2010) also reported relatively high activities with low molecular weight peptides from fish, included in a cryptic form in the sequence of the precursor protein molecules and released after the hydrolysis therefore the contribution to RSA of other components in the LAF mixture in addition to the formed protein hydrolysates cannot be ruled out (Wang *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Generally though, RSA in fish wastes has been attributed to proteins and peptides with increased hydrophobicity that displayed antioxidant properties as an important factor for increasing interaction with free radicals (Chalamaiah *et al.*, 2012; Chi *et al.*, 2015).

Conclusions

This work describes a detailed study on the important variables involved in the biotechnological process for exploitation of tuna wastes which can be used profitably toward production of added value protein hydrolysates, which besides nutritional value, could also present potential human and animal health promotion. The highest buffer capacity was estimated in the mixture of 27.9:33.3:39.3 of DM:V:HBF, which also contained high protein content, 84.24 ± 2.96 % slykes. In addition papaya represents a useful carbon source in tropical countries and therefore, the *Lactobacillus plantarum* fermentation of tuna using papaya fruit and molasses proved successful for this purpose. The potential scaling up of this biotechnological process is envisaged.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación del Distrito Federal (SECITI) (Project No. PICS012-152) and INSAM-FOINS/CONACYT No. 102/2012 for funding and CONACYT for PhD scholarship (MPC).

Nomenclature

b	a constant related to the initial conditions (when $t=0$, then $P = P_{\max} \exp(-b)$)
β_{\max}	maximum buffer capacity
CFU/mL	colony-forming units per milliliter
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
GHz	gigahertz
GRAS	generally recognized as safe

IC ₅₀	half of inhibitory concentration
k	acidification rate constant
LA	lactic acid
LAB	lactic acid bacteria
LAF	lactic acid fermentation
MRS	Man, Rogosa and Sharpe medium
P_{\max}	maximum LA produced ($t \rightarrow \infty$)
TNBS	2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid
U	unit of enzymatic activity
V_{\max}	maximum acid production rate

References

- Anson, M.L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *Journal of General Physiology* 22, 79.
- AOAC. (1997). Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists. Washington: *Association of Official Analytical Chemists*; pp1018
- Baicu, S.C., and Taylor, M.J. (2002). Acid-base buffering in organ preservation solutions as a function of temperature: new parameters for comparing buffer capacity and efficiency. *Cryobiology* 45, 33.
- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., and Nasri, M. (2009) Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry* 114, 1198.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, M., Guillochon, D., and Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry* 118, 559.
- Chalamaiah, M., Dinesh-Kumar, B., Hemalatha, R., and Jyothirmayi, T. (2012) Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chemistry* 135, 3020-3038
- Chi, C. F., Hu, F.Y., Wang, B., Li, Z.R., Luo, H.Y. (2015) Influence of amino acid compositions and peptide profiles on antioxidant capacities of two protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) dark muscle. *Marine Drugs* 13, 2580-2601.

- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 8, 350.
- Fabi, J.P., Cordenunsi, B.R., De Mattos Barreto, G.P., Mercadante, A.Z., Lajolo, F.M. and Oliveira do Nascimento, J.R. (2007) Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1- methylcyclopropene (1-MCP). *Journal of Agricultural Food Chemistry* 55, 6118- 6123.
- Flores-Albino, B., Arias, L., Gómez, J., Castillo, A., Gimeno, M., and Shirai, K. (2012) Chitin and L(+)-lactic acid production from crab (*Callinectes bellicosus*) wastes by fermentation of *Lactobacillus* sp B2 using sugar cane molasses as carbon source. *Bioprocess Biosystem Engineering* 35, 1193.
- Gómez, M., Lajolo, F., and Cordenunsi, B. (2002). Evolution of soluble sugars during ripening of papaya fruit and its relation to sweet taste. *Journal of Food Science* 67, 442.
- Góngora, H.G., Ledesma, P., Lo Valvo, V.R., Ruiz, A.E., and Breccia, J.D. (2012) Screening of lactic acid bacteria for fermentation of minced wastes of Argentinean hake (*Merluccius hubbsi*). *Food Bioprocess Process* 90, 767.
- Graham, J.B., and Dickson, K.A. (2004) Tuna comparative physiology. *Journal of Experimental Biology* 207, 4015.
- Je, J., Qian, Z., Byun, H., and Kim, S.K. (2007) Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry* 42, 840.
- Khalid, N.M., and Marth, E.H. (1990) Proteolytic activity by strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science* 73, 3068.
- Kumar, V., Reddy, C., Sreeramulu, D., and Raghunath. M. (2010) Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. *Food Research International* 43, 285.
- Kunitz, M. (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties *J Gen Physiology* 30, 291.
- Mishra, K., Ojha, H., and Kumar-Chaudhury, N. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry* 130, 1036.
- Pihlanto, A., and Korhonen, H. (2003). Bioactive peptides and proteins. *Advances in Food Nutrition Research* 47, 175.
- Ramírez-Ramírez, J.C., Huerta, S., Arias, L., Prado, A., and Shirai, K. (2008) Utilization of shrimp by-catch and fish wastes by lactic acid fermentation and evaluation of degree of protein hydrolysis and in vitro digestibility. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 7, 195-204.
- Reyes-Méndez, A.I., Figueroa-Hernández, C., Melgar-Lalanne, G., Hernández-Sánchez, H., Dávila-Ortiz, G. and Jiménez-Martínez, C. (2015). Production of calcium- and iron-binding peptides by probiotic strains of *Bacillus subtilis*, *B. clausii* and *B. coagulans* GBI-30. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 1-9.
- Shirai, K., and Ramirez-Ramirez, J.C. (2011). Utilization of fish processing by-products for bioactive compounds, in *Fish Processing-Sustainability and New Opportunities*, ed by Hall GM. Wiley Blackwell, UK. pp 1-29.
- Simpson, B.K. (2010) Digestive proteinases from marine animals. In *Seafood Enzymes: Utilization and influence on postharvest seafood quality*, ed by Haard NF and Simpson BK. First edition, Marcel Dekker, New York, USA. pp 191-213.
- Skelton, G.S. (1968) Papaya proteinases. I. Temperature-and pH-stability curves. *Enzymología* 35, 270.
- Sriket, C. (2014) Proteases in fish and shellfish: role on muscle softening and prevention. *International Food Research Journal* 21, 433.
- Todorov, S.D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J.G., and Franco, B. (2011). Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) from isolation to application: Characterization of a bacteriocin. *Food Research International* 44, 1351.

Carballo-Sánchez et al./ Revista Mexicana de Ingeniería Química Vol. 15, No. 1 (2016) 91-100

Wang, B., Li, B., Zeng, Q., and Liu, H. (2008) Antioxidant and free radical scavenging activities of pigments extracted from molasses alcohol wastewater. *Food Chemistry* 107, 1198.

Zhang, Z.S., Wang, X.M., Han, Z.P., Zhao, M.X., and Yin, L. (2012) Purification, antioxidant and moisture-preserving activities of polysaccharides from papaya. *Carbohydrate Polymers* 87, 2332.

11. Presentaciones en simposios y congresos derivadas del trabajo de tesis

- “Production of protein hydrolysates from tuna (*Thunnus albacares*) and *Carica papaya* by-products with radical scavenging activity determined by spectrophotometry and electron paramagnetic resonance” XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Cancún, Quintana Roo (2013)
- “Effect of lactic acid fermentation (LAF), *Carica papaya* carbon source and endogenous viscera enzymes in Tuna wastes (*Thunnus albacares*) protein hydrolysis”. 1st Biotechnology world symposium y 9° Encuentro Nacional de Biotecnología del IPN, Tlaxcala, Tlaxcala (2014)
- “Lactic Acid Fermentation: Drawing on waste from fishery and agricultural industries”. Sixth International Conference on Science in Society, Vancouver, Canadá (2014)

12. Referencias

Aguilar-Navarro J.A. “Composición nutricia del plancton del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México”. B.Sc. Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México. 2005. 56p.

Altunkaya, A. Miquel Becker, E. Gökmen, V. Skibstedb, L. (2009) “Antioxidant activity of lettuce extract (*Lactuca sativa*) and synergism with added phenolic antioxidants” Food Chemistry **115**:163–168

Anson, M.L., (1938) “The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin” Journal of General Physiology **22**:79-89

AOAC (1997) *Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists*. Association of Official Analytical Chemists 13th ed. Washington 1018p.

Baicu, S.C. y Taylor, M.J. (2002) “Acid–base buffering in organ preservation solutions as a function of temperature: new parameters for comparing buffer capacity and efficiency”. Cryobiology **45**:33-48

Bhaskar, N. Benila, T. Radha, C. Lalitha, R.G. (2008) “Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease” Bioresource Technology **99**:335–343

Biao-Shi, W. Bian-Sheng, L. Qing-Xiao, Z. Hui-Xia, L. (2008) “Antioxidant and free radical scavenging activities of pigments extracted from molasses alcohol wastewater” Food Chemistry **107**(3): 1198–1204

Bougatef, A. Nedjar-Arroume, N. Manni, L. Ravallec, R. Barkia, A. Guillochon, D. Nasri, M. (2010) “Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins”. Food Chemistry **118**: 559–565.

Referencias

- Chalamaiah, M. Dinesh-Kumar, B. Hemalatha, R. y Jyothirmayi, T. (2012) “Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review”. Food Chemistry **135**:3020-3038
- Chandra, R. Bharagava, R.N. Rai, V. (2008) “Melanoidins as major colourant in sugarcane molasses based distillery effluent and its degradation” Bioresource Technology **99**:4648-4660
10.1016/j.biortech.2007.09.057
- Chen, H.M. Muramoto, K. Yamauchi, F. Fujimoto, K. Nokihara, K. (1998) “Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein”. Journal of Agriculture and Food Chemistry **46**: 49-53
- Chen, N. Yang, H. Sun, Y. Niu, J. Liu, S. (2012) “Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates” Peptides **38**:344–349
- Chen, Y. y Jaczynski, J. (2007) “Protein recovery from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing byproducts via isoelectric solubilization/precipitation and its gelation properties as affected by functional additives”. Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**: 9079–9088
- CVCA (2010) *Monografía de la Papaya*, Comisión Veracruzana de Comercialización Agrícola, Gobierno del estado de Veracruz pp 1-16
- Dubois, M; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Reber, P.A.; Smith, F. (1956) “Colorimetric method for determination of sugars and related substances” Analytical Chemistry **8**:350-356
- Elias, R.J. Bridgewater, J.D. Vachet, R.W. Waraho, T. McClements, D.J. Decker, E.A. (2006) “Antioxidant Mechanisms of Enzymatic Hydrolysates of β -Lactoglobulin in Food Lipid Dispersions”. Journal of Agriculture and Food Chemistry **54**:9565–9572

Referencias

- Fabi, J.P. Cordenunsi, B.R. De Mattos Barreto, G.P. Mercadante, A.Z. Lajolo, F.M. y Oliveira do Nascimento, J.R. (2007) “Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1- methylcyclopropene (1-MCP)”. Journal of Agriculture and Food Chemistry **55**:6118-6123
- Feehily, C. Karatzas, K.A.G. (2013) “Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses”. Journal of Applied Microbiology **114**:11-24.
- Flores-Albino, B. Arias, L. Gómez, J. Castillo, A. Gimeno, M. y Shirai, K. (2012) “Chitin and L(+)-lactic acid production from crab (*Callinectes bellicosus*) wastes by fermentation of *Lactobacillus* sp B2 using sugar cane molasses as carbon source”. Bioprocess Biosystems Engineering **35**:1193–1200
- Gómez, M. Lajolo, F. y Cordenunsi, B. (2002) “Evolution of soluble sugars during ripening of papaya fruit and its relation to sweet taste”. Journal of Food Science **67**:442–447
- Góngora, H.G. Ledesma, P. Lo Valvo, V.R. Ruiz, A.E. y Breccia J.D. (2012) “Screening of lactic acid bacteria for fermentation of minced wastes of Argentinean hake (*Merluccius hubbsi*)” Food Bioproducts Processing **90**:767-772
- Graham, J.B. y Dickson, K.A. (2004) “Tuna comparative physiology”. Journal of Experimental Biology **207**:4015-4024
- Grimble, G. K., Keohane, P. P., Higgins, B. E., Kaminski, M. V., & Silk, D. B. (1986). “Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum” Clinical Science **71**:65–69.
- Harnedy, P.A., Fitzgerald, R.J. (2012) “Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review” Journal of Functional Foods **4**:6-24
- Huda Herpandi, N. Rosma, A. y Wan Nadiah, W.A. (2011) “The Tuna Fishing Industry: A New Outlook on Fish Protein Hydrolysates”. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **10**:195-207

Referencias

- Je, J. -Y., Qian, Z. -J., Byun, H. -G., & Kim, S. -K. (2007). "Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis". Process Biochemistry **42(5)**:840–846.
- Khalid, N.M. Marth, E.H. (1990) "Proteolytic Activity by Strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*". Journal of Dairy Science **73**:3068-3076.
- Kim, S-K. Ngo, D-H. Vo T-S. (2012) "Marine Fish-Derived Bioactive Peptides as Potential antihypertensive Agents" Advances in Food and Nutrition Research **65**:249-260
- Kilara, A., Shahani, K.M. (1977) "Preparation and properties of immobilized papain and lipase". Biotechnology and Bioengineering **14**:1703-1714
- Klomklao, S. Benjakul, S. Visessanguan, W. Kishimura, H. Simpson, B.K. (2007) "Purification and characterisation of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*)" Food Chemistry **100**: 1580-1589.
- Konings, W.N. Kok, J. Kuipers, O. Poolman, B. (2000) "Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium" Current Opinion in Microbiology **3(3)**:276-282.
- Kumar, V. Reddy, C. Sreeramulu, D. y Raghunath, M. (2010) Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. Food Research International **43**:285-288
- Kunitz, M. (1947) "Crystalline soybean Trypsin Inhibitor, II. General properties" Journal of General Physiology **30(4)**: 291-310.
- Lahogue, V. Réhel, K. Taupin, L. Haras, D. Allaupe, P. (2010) "A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity" Food Chemistry **118**:870-875
- Lee, S. -H., Qian, Z. -J., Kim, S. -K. (2010). "A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats" Food Chemistry **118**:96–102.

Referencias

Matsufuji, H. Matsui, T. Seki, E. Osajima, K. Nakashima, M. Osajima, Y. (1994) “Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolysate derived from sardine muscle” Bioscience Biotechnology and Biochemistry **57**: 922–925.

Matsui, T. Li, C.H. Osajima, Y. (1999) “Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ” Journal of Peptide Science **5**:289–297.

Matsumura, N. Fujii, M. Takeda, Y. Sugita, K. Shimizu, T. (1993) “Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels autolysate” Bioscience, Biotechnology and Biochemistry **57**: 695–697.

Marques, C. Amorim, M. Pereira, J. Estevez Pintado, M. Moura, D. Calhau, C. Pinheiro, H. (2012) “Bioactive Peptides - Are There More Antihypertensive Mechanisms Beyond ACE Inhibition?” Current Pharmaceutical Design **18**: 4706-4713

Mishra, K. Ojha, H. y Kumar-Chaudhury, N. (2012) “Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results”. Food Chemistry **130**:1036-1043

Millipore Corporation. Waters AccQ Tag™ Chemistry Package Instruction Manual, WAT052874, REV 0. Waters Corporation. Milford, Ma. 2009 131-138.

Nimalaratne, C. Bandara, N. y Wu, J. (2015) “Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white” Food Chemistry **188**:467–472

Palumbo, E. Favier, C.F. Deghorain, M. Cocconcelli, P.S. Grangette, C. Mercenier, A. Vaughan, E.E. Hols, P. (2004) “Knockout of the alanine racemase gene in *Lactobacillus plantarum* results in septation defects and cell wall perforation” FEMS Microbiology Letters **233**: 131-138.

Peterson, G. L. (1983) “Determination of total protein” Methods in Enzymology **91**:95–121.

Pihlanto, A. Korhonen, H.(2003) “Bioactive Peptides and Proteins” Advances in food and Nutrition Research **47**:175-277

Referencias

- Quatravaux, S. Remize, F. Bryckaert, E. Colavizza, D. Guzzo, J. (2006) "Examination of *Lactobacillus plantarum* lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters". Journal of applied microbiology **101**:903-912
- Ramírez, J.C., Huerta, S., Arias, L., Prado, A y Shirai, K. (2008). "Utilization of shrimp by-catch and fish wastes by lactic acid fermentation and evaluation of degree of protein hydrolysis and in vitro digestibility" Revista Mexicana de Ingeniería Química **7**:195-204.
- Rustad, T. Storrø, I. y Šližyte, R. (2011) "Possibilities for the utilisation of marine by-products" International Journal of Food Science and Technology **46**:2001–2014.
- Saavedra, L. Hebert E.M. Minahk, C. Ferranti, P. (2013) "An overview of "omic" analytical methods applied in bioactive peptide studies" Food Research International **51**:925-934
- Senevirathne, M. Kim, S. (2012). "Development of bioactive peptides from fish proteins and their health promoting ability." Advances in food and nutrition research **65**: 235-248.
- Shägger, H. (2006) "Tricine SDS-PAGE" Nature Protocols **1**:(16-22)
- Sharma, O. P. Bhat, T.K. (2009) "DPPH antioxidant assay revisited" Food Chemistry **113**: 1202–1205
- Shirai, K. Guerrero, I. Huerta, S. Saucedo, G. Castillo, A. Gonzalez, R.O. Hall, G.M. (2001) "Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste esilation" Enzyme microbial Technology **28**:446-452
- Simpson, B.K. "Digestive Proteinases from Marine Animals Seafood enzymes". En: Haard, N.F. Simpson, B.K. (Eds.) *Utilization and influence on postharvest seafood quality*, primera edición, Marcel Dekker, New York, USA. 2010 pp 191-213
- Skelton, G.S. (1968) "Papaya proteinases. I. Temperature-and pH-stability curves". Enzymologia **35**:270-274

Referencias

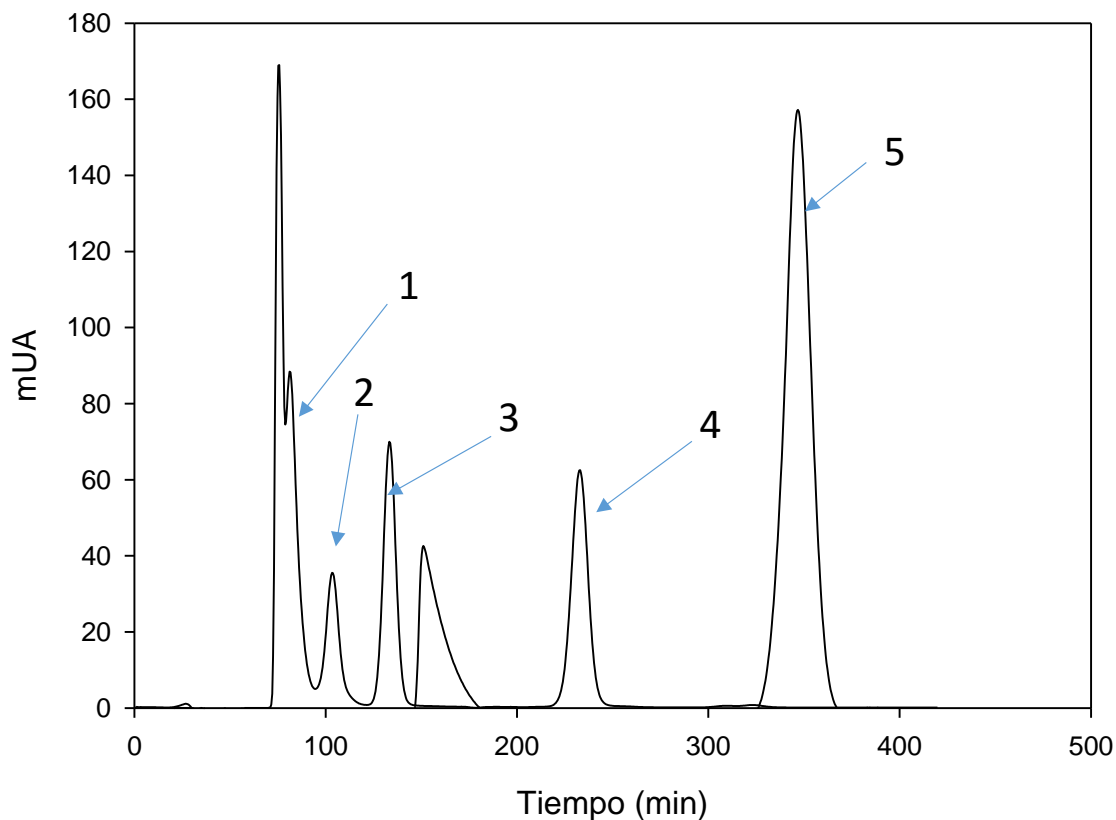
- Šližyte, R. Daukšas, E. Falch, E. Storrø, I. Rustad, T. (2005) “Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products” Process Biochemistry **40**:1415–1424
- Sriket, C. (2014) “Proteases in fish and shellfish: Role on muscle softening and prevention” International Food Research Journal **21**:433-445
- Suetsuna, K. (1998) “Isolation and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L (garlic)” Journal of Nutrition Biochemistry **9**:415–419.
- Todorov, S.D. Prévost, H. Lebois, M. Dousset, X. LeBlanc, J.G. Franco, B (2011) “Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) from isolation to application: Characterization of a bacteriocin” Food Research International **44**:1351-1363.
- Vijaya Kumar Reddy, C. Sreeramulu D Raghunath M. (2010) “Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India” Food Research International **43**:285-288.
- Wang, B. Li, B. Zeng, Q. Liu, H. (2008) “Antioxidant and free radical scavenging activities of pigments extracted from molasses alcohol wastewater” Food Chemistry **107**:1198-1204.
- Wu, J. Ding, X. (2001) “Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats” Journal of Agriculture and Food Chemistry. **49**:501–506.
- Xie, X.J. y Schaich, K. M. (2014) “Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical (DPPH) Assay for Antioxidant Activity” Journal of Agricultural and Food Chemistry **62**:4251–4260
- Yin, J. Miquel Becker, E. Andersen, M.L. Skibsted, L. (2012) “Green tea extract as food antioxidant. Synergism and antagonism with α -tocopherol in vegetable oils and their colloidal systems” Food Chemistry **135**: 2195–2202

Referencias

Zareian, M. Ebrahimpour, A. Abu Bakar, F. Sabo Mohamed, A.K. Forghani, B. Safuan, B.M. Ab-Kadir, B. Saari, N. (2012) “A Glutamic Acid-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Malaysian Fermented Foods” International Journal of Molecular Science **13**:5482-5497.

Zhang, Z.S. Wang, X.M. Han, Z.P. Zhao, M.X. Yin, L. (2012) “Purification, antioxidant and moisture-preserving activities of polysaccharides from papaya” Carbohydrate Polymers **87**:2332–2337

13. Anexo



Pico		pm (kDa)	TR (min)	mg
1	Tiroglobulina	670	81.31	5
2	γ -globulina	158	103.52	5
3	Ovalbúmina	44	133.39	5
4	Mioglobina	17	232.83	2.5
5	Insulina	5.8	346.88	6.94

Figura 1. Separación de estándar de proteínas mediante cromatografía de exclusión molecular con una columna Sephacryl S-100.