

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA**



**FUNCIONALIDAD DE HIDROLIZADOS ENZIMATICOS DE SUBPRODUCTOS  
DE CARPA DORADA (*Carassius auratus*)**

**TESIS**

Que para obtener el grado de  
Maestra en Biotecnología

**PRESENTA**

**Martha Patricia Estrada Corona**

Julio/2002

El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo consejo, con el convenio 471-0/ **Maestría en Biotecnología**

## RESUMEN

Las proteínas de origen animal y vegetal son empleadas como aditivos en alimentos por sus características funcionales las cuales pueden ser mejoradas mediante una hidrólisis enzimática. El objetivo de este trabajo fue evaluar la funcionalidad de hidrolizados de proteína de pescado, para lo cual se emplearon subproductos de carpa dorada como sustrato. La enzima utilizada fue Flavourzyme™ y se trabajó a pH 7 para favorecer la actividad exopeptidasa. Se estableció un tiempo de hidrólisis de 15 minutos, lo que permitió la obtención de fracciones de alto y de bajo peso molecular (mayores y menores de 30 KDa respectivamente), las cuales fueron separadas mediante ultrafiltración y posteriormente liofilizadas.

Se evaluó la solubilidad, el índice de actividad emulsificante (IAE) y la capacidad espumante al hidrolizado sin fraccionar, a las fracciones mayor y menor de 30 KDa, empleando como referencia un hidrolizado comercial de soya; la evaluación se realizó a diferentes valores de pH (4, 5, 6 y 7). La mayoría de las muestras presentaron una solubilidad superior al 80 % excepto la muestra del hidrolizado sin fraccionar a pH 5. La fracción mayor de 30 KDa presentó valores de IAE similares a los reportados para algunas proteínas tomadas como referencia de funcionalidad como la lactoglobulina, mientras que la fracción menor de 30 KDa presentó IAE's muy bajos, pero comparables con los valores obtenidos para el hidrolizado comercial de soya. El hidrolizado sin fraccionar y la fracción mayor de 30 KDa presentaron valores de capacidad espumante similares a los reportados para ovoalbúmina a pH 4; y superiores a los reportados para caseína. Por otro lado la fracción menor de 30 KDa aunque con valores de capacidad espumante bajos (sólo el 30% del valor obtenido para la fracción mayor de 30 KDa) presentó una buena estabilidad de espuma.

Se determinó el contenido de aminoácidos como parámetro para evaluar la calidad nutricional, tanto el hidrolizado de subproductos de carpa dorada (HSCD) como las fracciones mayor y menor de 30 KDa presentaron valores de aminoácidos esenciales superiores a los reportados por la FAO. El contenido de aminoácidos del hidrolizado de subproductos de carpa dorada fue muy similar al de los subproductos de carpa dorada. Se evaluó el sabor amargo mediante un análisis sensorial, el hidrolizado y las dos fracciones presentaron sabor amargo apenas perceptible, mientras que el hidrolizado comercial de soya presentó un sabor amargo claramente perceptible. Las propiedades funcionales son importantes para la utilización de los hidrolizados de proteína, pero es importante considerar otras características como las sensoriales y las nutricionales, es por eso que este trabajo pone de manifiesto que el hidrolizado obtenido de los subproductos de carpa dorada mediante la hidrólisis con Flavourzyme™, puede ser considerado como un buen aditivo en alimentos ya que no solo posee buenas propiedades funcionales como se mencionó con anterioridad sino que este es aceptable sensorial y nutricionalmente.

# INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	i
<b>INDICE GENERAL</b>	ii
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	iii
<b>INDICE DE TABLAS</b>	iv
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
<b>3. OBJETIVOS</b>	26
<b>4. MATERIALES Y METODOS</b>	27
<b>4.1 MATERIALES Y REACTIVOS</b>	28
4.1.1 Materiales	
4.1.2 Reactivos	
<b>4.2 MÉTODOS ANÁLITICOS</b>	29
4.2.1 Determinación de proteína	
4.2.2 Determinación de humedad	30
4.2.3 Determinación del grado de hidrólisis	
4.2.4 Electroforesis	31
4.2.5 Cromatografía de filtración en gel	
4.2.6 Ultrafiltración	
4.2.7 Liofilización	32
<b>4.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES</b>	32
4.3.1 Acondicionamiento de la muestra	
4.3.2 Análisis de la materia prima	
4.3.3 Condiciones de hidrólisis	33
4.3.3.1 Cinética de Flavourzyme™	
4.3.3.2 Grado de hidrólisis	
4.3.3.3 Perfil de pesos moleculares (PPM)	
4.3.4 Producción del hidrolizado	34
4.3.4.1 Hidrólisis	
4.3.5 Caracterización funcional	34
4.3.7.1 Solubilidad	
4.3.7.2 Capacidad emulsificante y estabilidad de emulsión	35
4.3.7.3 Capacidad espumante y estabilidad de espuma	36
4.3.6 Caracterización nutricional	37
4.3.7 Caracterización sensorial	
4.3.9.1 Selección del panel	38

- 4.3.7.2 Evaluación del sabor amargo
- 4.3.7.3 Análisis e interpretación de resultados

<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>39</b>
<b>5.1 CONTENIDO DE PROTEÍNA Y HUMEDAD DE LA MATERIA PRIMA</b>	<b>40</b>
<b>5.2 CONDICIONES DE HIDRÓLISIS</b>	<b>41</b>
5.2.1 Perfil de pesos moleculares	42
5.2.2 Grado de hidrólisis	43
5.2.3 Perfil de pesos moleculares por electroforesis	46
<b>5.3 HIDRÓLISIS DE LOS SUBPRODUCTOS DE CARPA DORADA</b>	<b>48</b>
<b>5.4 SEPARACIÓN DE FRACCIONES POR ULTRAFILTRACIÓN</b>	<b>49</b>
5.4.1 Eficiencia en la separación de fracciones	50
<b>5.5 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL</b>	<b>53</b>
5.5.1 Solubilidad	54
5.5.2 Índice de actividad emulsificante y estabilidad de emulsión	57
5.5.3 Capacidad espumante y estabilidad de espuma	61
<b>5.6 COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS</b>	<b>65</b>
<b>5.7 ANÁLISIS SENSORIAL</b>	<b>69</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>72</b>
<b>7. RECOMENDACIONES</b>	<b>75</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>76</b>
<b>ANEXOS</b>	

# **1 INTRODUCCIÓN**

Las proteínas constituyen uno de los principales componentes en los alimentos, razón por la cual la industria alimentaría requiere de nuevos concentrados proteicos para la elaboración de los mismos. Existen tres características que determinan el uso de las proteínas en la industria alimentaría: su calidad nutricional, sensorial y funcional (Charum y Galvéz, 1993). Por sus propiedades funcionales las proteínas de soya, los caseinatos y la clara de huevo deshidratada son claro ejemplo de las proteínas que son ampliamente usadas en la industria alimentaría. Sin embargo el alto costo de estas proteínas hace necesario, desde el punto de vista económico, su reemplazo por fuentes alternas de proteínas.

El músculo de pescado es una fuente de proteína altamente nutritiva, la cual es consumida en todo el mundo. Una gran fuente de proteína con alto valor nutricional está presente en los subproductos generados durante el procesamiento de las especies comerciales de pescado para obtener filetes o durante las operaciones de enlatado, así como en todas aquellas especies de pescado que no son comerciales (fauna de acompañamiento). Aunque esta proteína tiene una excelente calidad nutricional, no es atractiva por sus características sensoriales y por sus limitadas propiedades funcionales (Bárzana y García-Garibay, 1994).

El objetivo de este trabajo es llevar a cabo una hidrólisis parcial de la proteína de músculo de pescado mediante acción enzimática, para mejorar sus propiedades funcionales. Se presenta primero una revisión de los trabajos relacionados con el tema; posteriormente, la estrategia experimental y las metodologías empleadas para la obtención del hidrolizado, más adelante la discusión de los resultados obtenidos, así como las conclusiones del trabajo y finalmente las recomendaciones para futuras investigaciones.

## **2 ANTECEDENTES**

Las proteínas son empleadas en diversos sistemas alimenticios, no sólo por sus propiedades nutricionales sino también por las características que confieren a dichos sistemas. Ejemplos son: las del suero de leche y de huevo, solo que éstas tienen un alto costo, razón por la cual se han buscado otras fuentes de proteína que puedan ser utilizadas en la industria alimentaría. De acuerdo con la FAO, la cantidad de pescado capturado a nivel mundial en 1994 fue de aproximadamente  $100 \times 10^6$  toneladas, del cual cerca del 70-80% no es usado para consumo humano (Shahidi *et al.*, 1994). En este sentido los subproductos de proteína de pescado representan una excelente alternativa para la obtención de la deseada fuente de proteína. Sin embargo, esta proteína aunque posee buena calidad nutricional carece de propiedades funcionales adecuadas que permitan su uso directo en sistemas alimenticios.

### **2.1 PROPIEDADES FUNCIONALES**

Las propiedades funcionales son las características que determinan el comportamiento de proteínas en alimentos durante su procesamiento, almacenamiento y preparación (Matil, 1971). De acuerdo con Nakai y Powrie (1981), las propiedades funcionales están clasificadas de la siguiente manera:

- Sensoriales: olor, sabor, color y textura
- Hidratación: dispersabilidad, solubilidad y humectabilidad
- Tensoactivas: emulsificación, espumado, adsorción, incluyendo unión de grasa.
- Reológicas: incluyendo gelación y textura.
- Otras propiedades: adhesividad, cohesividad.

Las propiedades físicas y químicas que afectan la funcionalidad de las proteínas son el tamaño molecular, la forma, composición y secuencia de aminoácidos, carga neta y la distribución de cargas, hidrofobicidad, tipo de estructura, flexibilidad y rigidez molecular y la habilidad para interactuar o reaccionar con otros componentes (Damodaran, 1996).

Existen otros factores que pueden afectar la funcionalidad de las proteínas como son el pH, agua, iones, temperatura y la presencia de agentes oxidantes o reductores (Kinsella y Srinivasan, 1981).

De tal manera que se busca por un lado la recuperación de proteína presente en algunos subproductos (o desechos) de la industria alimentaria, pero por otro lado se desea que estas proteínas posean buenas propiedades funcionales. Por lo tanto se presentan a continuación los métodos empleados para la recuperación de la proteína de subproductos de la industria pesquera haciendo énfasis en las ventajas y desventajas que se presentan para la obtención de productos con aplicaciones potenciales.

## **2.2 MÉTODOS DE PROCESAMIENTO DEL PESCADO**

### **2.2.1 HARINAS**

Las harinas de pescado son productos obtenidos a partir de pescado fresco entero que se cuece, se prensa (para extraer parte del aceite), se seca generalmente en tambores rotatorios con calor directo y se muele. El proceso es sencillo pero el costo es elevado con respecto al precio del producto final. El valor nutricional del producto es bajo debido al método de secado empleado, adicionalmente presenta desventajas como un alto contenido de material no deseable, escamas huesos y vísceras, olor y sabor fuertes, ocasionados por los residuos de lípidos en el producto.

Otra desventaja de los productos obtenidos por este método son los problemas de rancidez debida a la oxidación acelerada de las grasas del pescado (cuando no se usan antioxidantes adecuados) y la falta de solubilidad y capacidad de emulsificación. Finalmente, a pesar de contener entre 50 y 60% de proteína cruda, el proceso de secado directo al que se somete el pescado, reduce marcadamente la digestibilidad de la proteína y su valor nutricional. Por estas razones las harinas de pescado son utilizadas principalmente como complemento proteico en alimento para ganado (Rivera, 1990)

### **2.2.2 CONCENTRADOS**

Un concentrado de proteína de pescado es un producto estable para consumo humano, preparado a partir de pescado entero, de otros animales acuáticos o parte de ellos. La concentración de proteína es incrementada al remover el agua y el aceite. El producto se deshidrata y su apariencia es la de un polvo, con olor y sabor que dependen del proceso empleado. Los productos así obtenidos tienen un elevado contenido proteico, generalmente entre 75 y 85%, y un bajo contenido de lípidos, comúnmente menor del 1%, tienen poco olor y sabor pero carecen de propiedades funcionales como solubilidad en agua y capacidad de emulsificación. Por estas razones los concentrados de proteína de pescado sólo se emplean como enriquecedores proteicos para alimentos en los que la solubilidad en agua y otras propiedades funcionales no son necesarias (Finch, 1977).

El costo del proceso para la obtención de los concentrados de proteína es elevado y la infraestructura necesaria requiere de inversiones elevadas. Una de las etapas del proceso que explican su elevado costo es la recuperación de los solventes empleados en la eliminación de la fracción lipídica del pescado.

### **2.2.3 AISLADOS**

Los aislados de proteína de pescado son productos similares en composición química a los concentrados de proteína de pescado. En estos productos la proteína se separa por precipitación en su punto isoeléctrico, y el aceite es eliminado por extracción empleando solventes orgánicos como el hexano o el isopropanol. La proteína así obtenida es prácticamente incolora y con un olor muy suave. Al igual que los concentrados los aislados proteicos son poco solubles en agua (Walton et al., 1972).

Los procesos requeridos para la elaboración tanto de concentrados como de aislados y la recuperación de estos por evaporación, es una de las partes más caras del proceso. Ha sido reportado que los residuos de algunos solventes utilizados en los procesos de extracción como el dicloroetano son tóxicos para diversas especies animales, como los becerros (Makdani, 1971).

La preparación de harinas, concentrados y aislados de proteína de pescado permiten la recuperación de proteína. Sin embargo, los productos obtenidos por estos métodos presentan propiedades nutricionales y funcionales pobres, además de que podrían tener residuos tóxicos, por esta razón se ha empleado la hidrólisis de las proteínas para mejorar las propiedades funcionales.

### **2.2.4 HIDROLIZADOS**

Los hidrolizados pueden ser definidos como proteínas que son química o enzimáticamente divididas en péptidos de diferentes tamaños (Skanderby, 1994). Los hidrolizados de proteína tienen una amplia aplicación en la industria de alimentos, incluyendo sustitutos de leche, suplementos proteicos, estabilizantes en bebidas, potenciadores de sabores en productos de confitería, etc. (Kristinsson y Rasco, 2000a).

#### **2.2.4.1 HIDROLIZADOS QUÍMICOS**

La hidrólisis química involucra la acetilación o succilación de las proteínas con ácidos anhídridos, fosforilación, glicosilación, tiolación y la alcalización reductiva. Esas modificaciones fueron señaladas para un cambio en la carga neta de la proteína por substitución de los grupos amino, con los cuales se influencia la solubilidad de las proteínas. Sin embargo, un cambio en la solubilidad no siempre va acompañada de cambios favorables en otras propiedades funcionales. Además la modificación química de las proteínas altera su digestibilidad (Panyam y Kilara, 1996).

El uso de sustancias alcalinas, las cuales han sido empleadas en algunos procesos, puede inducir la formación de compuestos tóxicos como lisinoalanina y reducir considerablemente el valor biológico del producto (Sikorski y Nack, 1981), sin embargo, bajo condiciones controladas, la calidad nutricional de la proteína puede ser mantenida a niveles adecuados (Mackie,1983).

#### **2.2.4.2 HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS**

Las primeras preparaciones de pescado hidrolizado enzimáticamente fueron elaboradas empleando las enzimas propias del tracto intestinal del pescado. Se obtenían productos con olores y sabores fuertes que tenían una vida de anaquel larga. Este proceso tenía como objetivo principal la conservación del pescado y los productos obtenidos presentaban un contenido elevado de proteínas pero su manejo era difícil ya que el proceso es largo y no se tenía control sobre la hidrólisis.

La hidrólisis enzimática de las proteínas por proteólisis controlada puede incrementar sus propiedades funcionales sobre un amplio rango de pH y otras condiciones de procesamiento (Panyam y Kilara, 1996). La selección del sustrato y enzima empleados y el grado de hidrólisis de la proteína puede afectar enormemente las propiedades fisicoquímicas de los hidrolizados resultantes (Mullally *et al.*, 1995).

La especificidad de la enzima al sustrato es también importante para la funcionalidad de los hidrolizados porque ésta influencia fuertemente el peso molecular y el balance hidrofóbico / hidrofílico (Gauthier *et al.*, 1993; Mullally *et al.*, 1994). La especificidad proviene del sitio de la proteína original en donde actúa la enzima; de aquí que algunas enzimas son denominadas endopeptidasas, las cuales dividen enlaces entre la cadena de la proteína, mientras que otras son llamadas exopeptidasas, ya que actúan sobre enlaces al final de la cadena de la proteína. Algunas enzimas atacan enlaces formados entre ciertos aminoácidos específicos. Tal especificidad definirá la extensión de la proteólisis y el tamaño de los péptidos obtenidos.

Flavourzyme™ es un complejo enzimático que posee actividad endo y exopeptidasa dependiendo del pH del medio, así a pH 5 se favorece la actividad endopeptidasa, mientras que a pH 7 la actividad exopeptidasa es favorecida.

En la tabla 2.1 se muestran diferentes tipos de proteínas que han sido modificadas enzimáticamente, indicándose también la enzima empleada. Aquí podemos observar que también se han empleado concentrados y aislados de proteínas que no poseen buenas propiedades funcionales, demostrando de esta manera que la hidrólisis enzimática es considerada la mejor manera de incrementar las propiedades funcionales de las proteínas. Por lo anterior la hidrólisis de proteínas por métodos enzimáticos presenta una mayor atracción comparada con los medios químicos, particularmente aquellos que involucran ácidos y álcalis.

Tabla 2.1 Proteínas hidrolizadas enzimáticamente

PROTEINA	ENZIMA	RESULTADOS
Concentrado de proteína de pescado	tripsina	Mejora en solubilidad y absorción de agua. Recuperación de Proteína del 76% <sup>1</sup>
Sardina	Alcalasa™	Solubilidad superior a 80% <sup>2</sup>
Pescado	Pescadasa™ 560 Proteasa™ HT – 200 Proteasa™ N	Solubilidad de 70 – 80%, lisina biodisponible 70 - 85% <sup>3</sup>
Concentrado de proteína de trigo	Tripsina y $\alpha$ – quimotripsina	Solubilidad 70 - 95%, emulsiones estables a pH 4 y fuerza iónica 0.6 <sup>4</sup>
Caseína	Pancreatina porcina	
Músculo de arenque	Alcalasa™ y Papaina	Alcalasa™ produjo menos amargor que Papaina, la extracción con etanol redujo marcadamente el amargo y olor a pescado <sup>6</sup>
Aislado de proteína de soya	Pancreatina Pronasa™ Alcalasa™, Tripsina, Liquozyme™ Pancreatina	Buena solubilidad y claridad. Mejora de solubilidad y actividad emulsificante <sup>7</sup>
Subproductos de langostino	Optimasa™	Condiciones optimas de hidrólisis <sup>8</sup>
Blanco del Pacifico	Alcalasa™ y Neutrassa™	Hidrolizado con alto contenido de proteína y composición de aác. <sup>9</sup>
Aislado de garbanzo	Alcalasa™	Mejora de calidad nutricional y reducción de alergenicidad <sup>10</sup>
Gluten de trigo	Alcalasa™, Neutrassa™ Papaina y Pepsina	Buenas propiedades espumantes con el uso de Pepsina y Papain. Buena emulsificación usando deamidación, Pepsina y Papaina <sup>11</sup>
Pollo, bonito	$\alpha$ – quimotripsina Pepsina, Tripsina y Bromelina.	Hidrolizado de pollo con Bromelina favoreció sabor umami <sup>12</sup>
Merluza roja	Flavourzyme™ y Savorasa™	Hidrolizado con gran potencial como saborizante <sup>13</sup>
Salmón del Atlántico	Alcalasa™, Flavourzyme™ 1000 L, Corolasa™ PN-L, y Corolasa™ 7089	Alta solubilidad a todos los GH's probados <sup>14</sup>

<sup>1</sup>Bhumiratana y Amundson, 1977. <sup>2</sup>Quaglia y Orban, 1987. <sup>3</sup>Rebeca et al., 1991. <sup>4</sup>Turgeon et al., 1992. <sup>5</sup>Mahmoud et al., 1992. <sup>6</sup>Hoyle y Merrit, 1994. <sup>7</sup>Mangino, 1994. Deesli y Cheryan, 1988; 1991. Lee et al., 1990. Hettiarachchy y Kalapathy, 1997. <sup>8</sup>Baek y Cadwallader, 1995. <sup>9</sup>Benjakul y Morrissey, 1997. <sup>10</sup>Clemente et al., 1999. <sup>11</sup>Mimouni et al., 1999. <sup>12</sup>Maeshashi et al., 1999. <sup>13</sup>Imm y Lee, 1999. <sup>14</sup>Kristinsson y Rasco, 2000b.

## **2.3 ESTUDIOS DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA PARA MEJORAR LAS PROPIEDADES FUNCIONALES EN PROTEINAS DE DIVERSAS FUENTES.**

### **2.3.1 SOLUBILIDAD**

Entre las propiedades funcionales de las proteínas, la solubilidad es probablemente la más crítica porque afecta a otras propiedades tales como la emulsificación, espumado y gelación (Kinsella, 1976; Hettiarachchy *et al.*, 1996).

Los factores que afectan la solubilidad de los hidrolizados son el pH, tamaño molecular, hidrofobicidad, fuerza iónica, el grado de hidrólisis que éstos presenten, la composición y proporción de aminoácidos polares y apolares, así como la secuencia en los polipéptidos.

El incremento en la solubilidad de diversas proteínas a través de la hidrólisis enzimática ha sido ampliamente reportado (Jost y Monti, 1977; Adler-Nissen y Olsen, 1979; Kester y Richardson, 1984; Turgeon *et al.*, 1992). Esos estudios han demostrado que la hidrólisis limitada o parcial produce incrementos substanciales en la solubilidad de los hidrolizados resultantes, particularmente en el punto isoeléctrico de las proteínas nativas (Mahmoud, 1994).

El rompimiento enzimático de proteínas involucra un importante cambio estructural en la proteína cuando ésta es gradualmente dividida en pequeñas unidades de péptidos, proporcionando mayor solubilidad que aquella de proteína sin hidrolizar. El incremento en la solubilidad se debe parcialmente al menor tamaño de los péptidos, pero más importantemente al delicado balance de las fuerzas hidrofóbicas e hidrofílicas de los péptidos. Los péptidos más pequeños proveniente de las proteínas miofibrilares están expuestos para tener proporcionalmente residuos más polares y poseen mayor capacidad para formar puentes de hidrógeno con el agua incrementando la solubilidad comparada con la de la proteína intacta (Kristinsson y Rasco, 2000a).

Kristinsson y Rasco (2000b) evaluaron la solubilidad de hidrolizados de salmón del Atlántico a diferentes grados de hidrólisis (5, 10, 15%) empleando como referencia albúmina de huevo y un concentrado de proteína de soya. Ellos encontraron que la solubilidad de los hidrolizados de salmón fue mucho mayor a pH 7 (con NaCl 0.1M) teniéndose en la mayoría de los casos una solubilidad entre 95 y 100%. La solubilidad de la albúmina de huevo fue muy similar a la de los hidrolizados de salmón, mientras que el concentrado de proteína de soya fue marcadamente menos soluble que los hidrolizados de salmón. Esta excelente solubilidad de los hidrolizados de salmón comparada con la del concentrado de proteína de soya indica que pueden tener muchas aplicaciones potenciales en sistemas de alimentos formulados en donde se requiera de proteína soluble.

Los resultados de la proteína soluble obtenida por la hidrólisis de pescado con Pescadasa 560, Proteasa HT-200 y Proteasa N, fueron reportados por Rebeca *et al.* (1991). Ellos encontraron que la proteína fue solubilizada más rápido con Pescadasa 560 que con las proteasas HT-200 y N. Además reportan que el incremento en la solubilidad presenta una relación lineal con el tiempo cuando la hidrólisis se lleva a cabo con Proteasa HT-200, mientras que con Proteasa N y Pescadasa 560, el 98% de la variación experimental de la solubilización en función del tiempo queda explicado por un modelo exponencial.

Los hidrolizados de salmón mostraron una solubilidad similar a la del músculo de arenque hidrolizado con Alcalasa™ y Papaina (Hoyle y Merrit, 1994) y la del músculo de sardina hidrolizada con Alcalasa™ (Quaglia y Orban, 1987). Otros estudios con hidrolizados de proteína de pescado han presentado la solubilidad como una función del pH, en donde se ha observado que la solubilidad decrece ligeramente cerca del punto isoeléctrico (Vieira et al., 1995; Onodenaloro y Shahidi, 1996).

Quaglia y Orban (1987) definieron como buena solubilidad aquellos péptidos que presentaron valores superiores al 80% en hidrolizados de proteína de pescado de sardinas en un rango de pH de 5 a 9, independiente del grado de hidrólisis, sin embargo en un rango de pH de 2 a 5 la solubilidad decrece, siendo más pronunciado en esos alimentos con un bajo grado de hidrólisis.

Existen otros reportes que indican que la solubilidad se incrementa conforme el pH se aproxima a la alcalinidad, en algunos casos la máxima solubilidad se alcanza en la neutralidad a pH 7, como se reportó para el aislado de proteína de trigo, el huevo blanco seco y el caseinato de sodio, los cuales mostraron un máximo valor de solubilidad a pH 7.5, siendo éste ligeramente superior al 60%, mientras que a pH 4.5 el aislado de proteína de trigo y el caseinato de sodio fueron prácticamente insolubles (Ahmedna et al., 1999).

### **2.3.2 CAPACIDAD EMULSIFICANTE**

Las propiedades de emulsificación de las proteínas juegan un papel importante en diversas aplicaciones en alimentos y son algunas de las propiedades más importantes que necesitan ser evaluadas. Varios factores y condiciones influyen en las propiedades de emulsificación, éstos incluyen: características estructurales y químicas, grado de hidrólisis, contenido y arreglo de los aminoácidos, peso molecular, regiones hidrofóbicas y condiciones que prevalecen en el medio (temperatura, pH y efectos iónicos) (Kinsella, 1979; Parker, 1987).

Durante la emulsificación toman lugar tres procesos: rompimiento de las gotas formadas durante la formación de la emulsión, las moléculas de proteína son adsorbidas dentro de la nueva superficie creada. La coalescencia durante la emulsificación es más probable durante la agitación vigorosa que durante el subsiguiente almacenamiento (Walstra, 1983).

Durante la adsorción en la interfase, las proteínas se desdobl原因 para formar una película interfacial cohesiva con los residuos hidrofóbicos interactuando con el aceite y los residuos hidrofílicos con agua (Phillips, 1981). Así la flexibilidad molecular facilita que suceda un cambio conformacional o desdoblamiento en la interfase. Las medidas de la capacidad emulsificante pueden ser consideradas como un índice de la habilidad de la proteína o péptidos a adsorber dentro de la nueva superficie creada y retarda la coalescencia durante la emulsificación (Dagorn–Scaviner *et al.*, 1987). La capacidad emulsificante puede representar una medida de la afinidad del emulsificador por el aceite (Turgeon *et al.*, 1992).

Generalmente, el peso molecular de los hidrolizados tiene una mayor influencia sobre sus propiedades de emulsificación. Varios reportes (Kuehler y Stine, 1974; Adler- Nissen y Olsen, 1979; Lee *et al.*,1987) han sugerido que existe un peso molecular o tamaño de cadena óptimo para que los péptidos proporcionen buenas propiedades emulsificantes. Lee *et al* (1987) postularon que los péptidos deberían tener una longitud de cadena mayor de 20 residuos para tener buenas propiedades emulsificantes. Aunque péptidos pequeños difunden rápidamente y se adsorben en la interfase, éstos tienen menos eficiencia en la reducción de la tensión superficial ya que no pueden desdoblarse y reorientar en la interfase como las proteínas o los péptidos de mayor tamaño.

La hidrofobicidad de las proteínas hidrolizadas es también un factor que influencia sus propiedades de emulsificación (Nakai *et al.*,1980). Mahmoud *et al* (1992) reportaron una fuerte correlación entre actividad emulsificante y la hidrofobicidad de los hidrolizados de caseína durante una hidrólisis extensiva por pancreatina porcina. Ellos demostraron que la actividad emulsificante de los hidrolizados decrece linealmente con el aumento en el grado de hidrólisis.

Quaglia y Orban (1990) reportaron la influencia del grado de hidrólisis sobre la estructura y propiedad emulsificante de sardina (*Sardina pilchardus*) realizada con Alcalasa. Ellos encontraron que la hidrólisis enzimática extensiva tiene una influencia negativa sobre la capacidad de los hidrolizados para formar y estabilizar emulsiones. Mientras que los hidrolizados con bajo grado de hidrólisis tienen mejores propiedades emulsificantes.

Hettiarachchy y Kalapathy (1997) Compararon el efecto del pH sobre las propiedades de emulsificación de un aislado de proteína de soya hidrolizado con Pancreatina (APSP) con un grado de hidrólisis de 15%, un control de aislado de proteína de soya con 120 minutos de incubación (CAPS – 120) y un aislado de proteína de soya (APS). El APSP, CAPS-120 y APS tuvieron los índices de actividad emulsificante (IAE) más bajos a pH 4.0 – 5.0 (región isoeléctrica del APS), y el IAE incrementó por arriba y por debajo de esa región. Los bajos IAE's a pH 4.0- 5.0 pueden deberse al incremento de la interacción proteína – proteína, resultando en baja hidrofobicidad superficial y decremento de la carga neta, y solubilidad de las proteínas. En la región isoeléctrica, la proteína de soya asume una estructura más rígida y estable lo cual es más resistente al desdoblamiento y formación de la película en la interfase. De cualquier manera la estabilidad de la emulsión se incrementó conforme se incrementó el pH. El incremento de la concentración de la proteína en la interfase podría incrementar la formación de la película interfacial y de ahí que mejore la estabilidad de la emulsión (Mangino, 1994). Los IAE's del APSP fueron más altos significativamente ( $p < 0.05$ ) a pH's mayores de 5, comparados con los de CAPS y APS, este incremento se puede deber a la mayor exposición de los grupos hidrofílicos / hidrofóbicos del APSP a valores más altos de pH.

Turgeon *et al* (1992) evaluaron la capacidad emulsificante (CE) de un concentrado de proteína de trigo hidrolizado con tripsina sobre un rango de pH de 3 a 9 a dos fuerzas iónicas (0 y 0.6) y se encontró que en el agua desionizada (fuerza iónica = 0) la CE del concentrado de proteína de trigo hidrolizado decreció gradualmente de pH 3 a 9, mientras en la presencia de sales la capacidad emulsificante fue estable a pH ácido y neutro e incrementó a pH 9. La repulsión electrostática incrementada de pH 4 a 9 a una fuerza iónica de 0, podría haber sido cancelada en la presencia de sales. Además las sales pueden inducir algunos cambios de conformación, liberando regiones hidrofóbicas para una interacción más efectiva con el aceite. Los mismos autores evaluaron la CE del hidrolizado total de trigo y además de la mezcla de los polipéptidos (MP) obtenidos después de la separación por ultrafiltración de los pequeños componentes como una función de pH a dos fuerzas iónicas. El comportamiento de las fracciones peptídicas fue más compleja que el de las proteínas sin hidrolizar. La CE del hidrolizado total y de las fracciones de MP fue más baja que la de las proteínas nativas en el rango de pH ácido, mientras que algunas fracciones tuvieron una mejor CE a pH 7 y 9. El hidrolizado total y las fracciones de la MP mostraron un comportamiento similar a varios niveles de pH y fuerza iónica.

### **2.3.3 CAPACIDAD ESPUMANTE**

La capacidad de las proteínas para formar y estabilizar espumas depende de varios parámetros tales como el tipo de proteína y grado de desnaturalización, la presencia o ausencia de iones de calcio, pH, temperatura, métodos de batido y otros componentes químicos (lípidos, carbohidratos) (Fenema, 1996; Townsend y Nakai, 1983). Las espumas son sistemas coloides bifásicos con una fase líquida o acuosa y una fase de gas o de aire dispersa. Las espumas de alimentos son normalmente producidas por agitación o batido, y el método usado influencia las características de la espuma.

La capacidad espumante (medida como el volumen de espuma formada y usualmente expresada como porcentaje de sobre volumen) y la estabilidad (la cual se mide como el tiempo que tarda en colapsarse la espuma) son dos de las características comunes de espumas.

En un estudio realizado por Ahmedna *et al.*, (1999) en donde se evaluó la capacidad espumante de un aislado de proteína de trigo solubilizado, huevo blanco seco, aislado de proteína de soya y caseinato de sodio, todas las suspensiones se prepararon al 3% (p/v). Se observó que la capacidad espumante del aislado de proteína de soya solubilizada (1.67 mL/ mL de suspensión) fue más alta que la del aislado de proteína de soya (1.35), y que la del huevo blanco seco (1.35), pero menor que la del caseinato de sodio (2.0). Sin embargo en presencia de 0.5% (p/v) de cloruro de calcio incrementó ( $p < 0.05$ ) la capacidad espumante del aislado de proteína de trigo solubilizada de 1.67 a 2.47 y consecuentemente fue más alta que la del caseinato de sodio. La capacidad del aislado de proteína de trigo para formar espumas alrededor del pH neutro en este estudio puede ser atribuido a su mayor solubilidad. Porque la proteína solubilizada requiere altas cargas netas, las cuales influyen la adsorción de las proteínas en la interfase agua – aire (Cherry y Watters, 1981), la proteína altamente soluble mejora la capacidad espumante. La estabilidad de la espuma del aislado de proteína de trigo fue comparable a la de las otras proteínas. Aunque la solubilidad de la proteínas se requiere frecuentemente para la formación de espuma, esto no siempre puede ayudar a estabilizar la espuma, como en el caso del caseinato de sodio. Por ejemplo, la solubilidad y capacidad espumante del caseinato de sodio fue más alta que las del aislado de proteína de trigo, pero la estabilidad de la espuma fue ligeramente menor que la del aislado de proteína de trigo solubilizada. La capacidad espumante de las proteínas del trigo incrementa con la hidrólisis limitada pero la estabilidad de la espuma decrece.

Cuando fueron obtenidos péptidos pequeños con Alcalasa y separados por ultrafiltración, la capacidad y estabilidad de las espumas de los permeados fueron comparables con aquellas de huevo blanco. Esos resultados indican que los péptidos más grandes y proteínas sin hidrolizar ejercen un efecto inhibitorio sobre la propiedad espumante que los péptidos pequeños, por interacción hidrofóbica o por impedimento estérico en la interfase (Ahmedna *et al.*, 1999).

Phillips (1992) reportó que la espuma formada por  $\beta$ -lactoglobulina a pH 5 presenta la más alta estabilidad pero no el más alto sobrevolumen. A pH 5 (cerca del punto isoeléctrico) fue observada una agregación, la cual reduce notablemente la cantidad de proteína disponible para la formación de la película. Sin embargo, las películas formadas son probablemente delgadas y más estables, lo cual facilita la formación de la estructura de la red en la película de proteína que resulta en un incremento de las propiedades reológicas de la película, por lo que se incrementa la estabilidad de la espuma (Phillips *et al.*, 1989, 1990).

#### **2.3.4 CALIDAD NUTRICIONAL**

La calidad nutricional de la proteína está caracterizada por tres factores: el contenido de aminoácidos esenciales, digestibilidad de la proteína y el contenido de aminoácidos biodisponibles. El valor biológico de las proteínas en los hidrolizados de proteína de pescado es generalmente tan bueno como el de la especie de pescado de la que son obtenidos. Sin embargo se ha reportado que el hidrolizado obtenido por tratamiento con Alcalasa y Pancreatina ha mostrado una reducción en el contenido de valina, con una correspondiente reducción sobre la utilización neta de proteína (NET) y valor biológico (Lalacidis y Sjoberg, 1978).

La composición de aminoácidos del material inicial es esencial como evidencia de la destrucción durante la hidrólisis. Dependiendo del tipo de hidrólisis usada se puede presentar la pérdida de sulfuro de los aminoácidos como cisteína, metionina y también de triptofano lo cual puede reducir la calidad nutricional (Mackie, 1983).

La composición de aminoácidos proporciona un importante parámetro cuantitativo en la caracterización de muestras de aislados de proteína o péptidos. El método de hidrólisis más utilizado en la determinación de aminoácidos emplea HCl 6 N e incubación a 110°C durante 20 ó 24 horas bajo condiciones de vacío.

La pérdida de peso en ratas alimentadas con fórmulas elaboradas con hidrolizados de proteína de pescado como única fuente de proteína fue reportada por Rebeca *et al.* (1991). Ellos reportan además que el valor nutricional fue 10 ó 15% más bajo que el de las ratas alimentadas con caseína. Sin embargo, a pesar de esto, los autores manifiestan que estos resultados sugieren que los hidrolizados de proteína de pescado por su valor nutricional, pueden ser usados como substitutos de leche para becerros.

Benjakul y Morrisey (1997) reportaron los resultados de la hidrólisis de subproductos sólidos de Blanco del Pacífico llevada a cabo con Alcalasa™ y Neutrasa™, ellos encontraron que las condiciones óptimas para la hidrólisis fueron: 60°C a pH de 9.5 y 55°C a pH de 7, respectivamente. Además notaron que el hidrolizado de sólidos de Blanco del Pacífico tiene un alto contenido de aminoácidos y este es similar al del músculo de Blanco del Pacífico. Tabla 2.2.

**Tabla 2.2 Contenido de aminoácidos del hidrolizado de los desechos sólidos de Blanco del Pacífico (DSBP)**

AMINOÁCIDO	PORCENTAJE DE PROTEINA TOTAL		
	Hidrolizado seco	DSBP	Músculo de BP
Alanina	6.53	6.45	5.51
Arginina	7.29	7.71	7.28
Ac. Aspártico	10.10	9.72	10.50
Cisteina	0.92	0.82	1.13
Ac. Glutámico	13.80	18.50	15.00
Glicina	7.88	8.09	3.87
Histidina	2.10	2.19	2.35
Isoleucina	4.30	4.28	4.97
Leucina	7.16	7.08	8.05
Lisina	8.33	8.19	10.20
Metionina	3.02	2.96	3.20
Fenilalanina	3.80	3.87	4.06
Prolina	6.00	6.25	4.04
Serina	5.33	5.35	4.80
Treonina	5.12	4.86	4.86
Triptofano	0.14	0.65	0.95
Tirosina	3.50	3.38	4.18
Valina	4.72	4.61	4.94

Benjakul y Morrissey, (1997)

### **2.3.5 CALIDAD SENSORIAL**

Los atributos responsables de la calidad sensorial de las proteínas que pueden ser utilizadas como aditivos en alimentos son: color, olor y sabor. En el caso de los hidrolizados de proteína de pescado el color depende de los pigmentos de la pulpa presentes en especies particulares usadas como materia prima. Algunos productos, tales como los hidrolizados secos son polvos con un ligero color café. El hidrolizado líquido producido por una compañía japonesa fue rosa cuando fue obtenido de salmón rojo, mientras que el producto fue blanco cuando la materia prima fue Pollack y beige si este era obtenido del Cangrejo nieve (Sikorski y Nack, 1981).

El olor específico de los productos del pescado es debido principalmente a la oxidación de los lípidos. La composición y concentración de esos lípidos depende de la especie de la cual proviene la materia prima (si tiene alto o bajo contenido de grasa), la polaridad del solvente o solventes usados durante la extracción y las condiciones de extracción. Si los lípidos residuales están presentes en concentraciones de alrededor de 0.1% la vida del producto puede ser totalmente aceptable, sin embargo sólo con concentraciones de lípidos de 0.05% o menos se pueden obtener productos con estabilidad aceptable. Otro factor importante en términos de olor son los compuestos que contienen aminos y sulfuros. Estos compuestos son volátiles y pueden ser removidos por operaciones de deodorización. La calidad del sabor de los hidrolizados depende de varios parámetros, entre éstos las características de la materia prima juega un papel crítico en la determinación de la calidad del sabor. Las especies grasas de pescado no son deseables por su alta susceptibilidad a la oxidación de lípidos y el alto costo para remover el exceso de grasa (Richie y Mackie, 1982).

Los hidrolizados de proteína de pescado adquieren un sabor amargo y a umami (sabor a glutamato monosódico, que es un potenciador de sabor), ambos producto de las reacciones de hidrólisis; mientras el primer sabor es indeseable, el segundo puede ser un atributo deseable (tiene una actividad potenciadora de sabor), particularmente si el producto es usado como un extensor de carne o adicionado a sopas.

Cuando los hidrolizados tienen sabores amargos éstos están relacionados con el rompimiento de las proteínas durante la hidrólisis. Debido a que la secuencia primaria de aminoácidos en la proteína nativa dicta fuertemente el grado de amargor en el producto. La intensidad del sabor amargo depende del grado de hidrólisis y la especificidad de la proteasa, por ejemplo el tamaño de los péptidos y el tipo de enlace peptídico que fue dividido. El sabor amargo de los péptidos está relacionado con la hidrofobicidad de los péptidos liberados durante la hidrólisis. La proteólisis por endopeptidasas provoca el desarrollo de sabor amargo, mientras que una extensiva hidrólisis usando exopeptidasas libera una considerable cantidad de aminoácidos con amargor casi imperceptible (Lalasis y Sjoberg, 1978; Barzana y García-Garibay, 1994).

Kato *et al* (1989) reportaron que los umbrales de amargor para arginina, leucina fenilalanina y valina fueron 50, 190, 90 y 40 mg/100mL, respectivamente. Más tarde Fuke en 1994 confirmó que aminoácidos hidrofóbicos tales como arginina, leucina, fenilalanina y valina contribuyen principalmente al amargor.

Yu y Fazidah (1994) encontraron una conexión entre el grado de hidrólisis y la intensidad de amargor cuando hidrolizaron *Aristichthys nobilis* con una proteasa comercial. El amargor se incrementó con el grado de hidrólisis no se observó amargor después de 4 horas de hidrólisis, pero después de 5 horas de hidrólisis las muestras fueron descritas como “muy amargas”.

La proteína de Arenque hidrolizado con papaina tuvo valores más altos de amargor que cuando se hidrolizó con Alcalasa. Las muestras hidrolizadas con Alcalasa™ a mayores grados de hidrólisis (GH) fueron menos amargas que las muestras hidrolizadas con papaina a los mismos GH (Hoyle y Merrit, 1994).

Deeslie y Cheryan (1988) realizaron la evaluación del sabor amargo de un hidrolizado de proteína de soya (HPS), se evaluó también un hidrolizado comercial. Las fracciones obtenidas del aislado de soya hidrolizado con Pronasa y otro hidrolizado con Alcalasa fueron separados por ultrafiltración. Las muestras fueron preparadas al 1% (p/v), se empleó dihidrocloruro de quinina como compuesto referencia de amargor a concentraciones 0.0001 – 0.0008% (p/v) (Ricks *et al.*, 1978). Los resultados del análisis de la evaluación sensorial indicaron que las fracciones obtenidas con Pronasa™ y el aislado de soya fueron significativamente menos amargos que las fracciones obtenidas con Alcalasa™ y el producto comercial. Esto se pudo deber a que Alcalasa™ no posee actividad exopeptidasa, ya que las exopeptidasas son enzimas que tienen la particularidad de generar péptidos poco amargos (Novo,1977; Barzana y García-Garibay, 1994). Estos resultados son particularmente interesantes debido a que el amargor está más frecuentemente asociado con los péptidos de bajo peso molecular. El peso promedio del peso molecular de los hidrolizados separados por ultrafiltración fue de aproximadamente 2000 Da.

Arai *et al* (1970) reportaron que un tamaño molecular de 2400 Da o menos es suficiente para promover el amargor, pero Fujimaki *et al* (1968) encontraron que los péptidos de los hidrolizados de proteína de soya con mayor amargor fueron los que tenían un peso molecular de 1500 Da o menos. Los resultados de Deeslie y Cheryan (1991) concuerdan con lo reportado por Adler–Nissen (1986), que el amargor se incrementa con la proteólisis limitada, pero decrece sobre una hidrólisis extensiva.

Maeshashi *et al.*, (1999) reportaron la evaluación de las propiedades del sabor de proteínas de soya, caseína, bonito y pollo hidrolizadas con 4 proteasas: Pepsina, Tripsina,  $\alpha$ -Quimotripsina y Bromelina. Para caracterizar el sabor emplearon soluciones de glutamato monosódico (0.05%) para sabor umami, NaCl (0.5%) para salinidad, ácido tartárico (0.05%) para sabor agrio, sacarosa (0.2%) para dulzor y cafeína (0.1%) para amargor (como estándares de sabor promedio (+ +)). El sabor de los hidrolizado de proteína de soya y de caseína fue sólo amargor, mientras que en las proteínas de pollo y bonito fue principalmente amargor, se detectó en algunos hidrolizados sabor umami o agrio. Los autores indicaron que el amargor podría presumiblemente enmascarar los otros sabores (umami o agrio) en los hidrolizados, así que el sabor del hidrolizado podría ser reconocido como amargo, siempre que la variedad de sabores pueda existir.

Otro estudio para evaluar el sabor amargo en hidrolizados de pescado fue realizado por Imm y Lee (1999), ellos realizaron la hidrólisis de merluza roja (*Urophycis chuss*) empleando Flavourzyme™ y Savorasa™ y evaluaron el sabor amargo. Las soluciones de los hidrolizados fueron preparadas al 3% (p/v) en agua (20°C) y el sabor se evaluó empleando una escala hedónica de 9 puntos. El hidrolizado de Savorasa™ mostró un valor de amargor relativamente más alto que el hidrolizado de Flavourzyme y además tuvo un GH también más alto (40.7 y 35.8% para Savorasa™ y Flavourzyme™, respectivamente). Barzana y García-Garibay (1994) sugirieron que la intensidad de amargor depende del grado de hidrólisis y especificidad de la enzima porque los aminoácidos hidrofóbicos responsables del amargor pueden ser liberados por endopeptidasas. De cualquier modo con un incremento en el grado de hidrólisis, más aminoácidos hidrofóbicos podrían ser generados del interior de las cadenas peptídicas, resultando en un incremento de amargor como en el caso de Savorasa™. Los hidrolizados tuvieron una intensidad de sabor umami mucho más alto que el de las muestras sin hidrolizar, pero no hubo diferencia significativa en amargor entre ellos.

Aunque que los hidrolizados de proteína de pescado (HPP) son altamente nutritivos y seguro que sus propiedades funcionales son buenas, las propiedades sensoriales son extremadamente importantes para la adaptación y aceptación final por la industria de alimentos y los consumidores. Por tanto es importante considerar la especie de pescado con la que se desea obtener estos hidrolizados y tener un control del proceso de hidrólisis que garantice la obtención de hidrolizados aceptables sensorialmente.

De acuerdo a todo lo anterior la obtención de hidrolizados de proteína de pescado con buenas propiedades funcionales, y calidad nutricional y sensorial aceptables dependen de factores que incluyen: la especie de pescado a trabajar, el tipo de enzima a emplear así como las condiciones a las cuales se lleva acabo el proceso para garantizar un grado de hidrólisis que permita obtener fracciones con el tamaño molecular adecuado, el cual puede ser seleccionado mediante la utilización de ultrafiltración. Todos estos factores pueden ser controlados para obtener productos con aplicaciones potenciales y dirigidas a usos específicos en la industria alimentaría.

### **3 OBJETIVOS**

#### GENERAL:

Evaluar la funcionalidad de péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática de subproductos de carpa dorada (*Carassius auratus*).

#### PARTICULARES:

Establecer las condiciones de hidrólisis para la obtención de péptidos por la hidrólisis enzimática de los subproductos de carpa dorada con Flavourzyme™.

Evaluar el efecto del tamaño molecular de los péptidos del hidrolizado de subproductos de carpa dorada sobre las propiedades funcionales de solubilidad, capacidad emulsificante y capacidad espumante de los péptidos obtenidos.

Evaluar el efecto del pH sobre la solubilidad, capacidad emulsificante y capacidad espumante.

Evaluar la calidad sensorial y nutricional de los péptidos del hidrolizado de subproductos de carpa dorada.

Comparar las características funcionales, sensoriales y nutricionales del hidrolizado de subproductos de carpa dorada y sus fracciones con un hidrolizado comercial de soya.



## 4 MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1 MATERIALES

#### 4.1.1 MATERIA PRIMA

Se emplearon subproductos de carpa dorada (*Carassius auratus*), provenientes del fileteado de pescado que no cumple con el tamaño específico del filete por lo que sólo esta constituido por músculo y piel. Dicho material fue donado por el Centro Regional de Investigación Pesquera, Tamaulipas. Se empleó un hidrolizado comercial de soya como referencia.

#### 4.1.2 ENZIMA

Se empleó la enzima Flavourzyme™ 1000 L, proporcionada por Novo Nordisk. Flavourzyme™ es un complejo fúngico proteasa/peptidasa producido por *Aspergillus oryzae* (la cual no ha sido modificada genéticamente) mediante fermentación sumergida, este complejo enzimático contiene ambas actividades endo y exopeptidasa. El rango de pH óptimo para el complejo enzimático es de 5 a 7. La actividad endopeptidasa se ve favorecida a pH 7, mientras que la actividad exopeptidasa se presenta en mayor proporción a pH 5.

La actividad de la enzima se expresó en Unidades Amino Leucina Peptidasa por gramo (LAPU g<sup>-1</sup>), un LAPU es la cantidad de enzima que hidroliza 1µmol de L-leucina -p nitroanilida por minuto a 50°C, pH 7 (Novo Nordisk, 2000).

#### 4.1.3 REACTIVOS

Se emplearon reactivos grado analítico de Bio-Rad, Beckman, Sigma y Baker.

## **4.2 MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **4.2.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA**

El contenido de proteína se determinó empleando el método modificado de Lowry (Peterson, 1977) para lo cual se construyó una curva patrón empleando como proteína de referencia sero albúmina bovina (BSA) (Anexo A).

#### **SOLUCIONES:**

Carbonato de sodio	10%
Tartrato de sodio	0.1%
Potasio y sulfato de cobre (CTC)	0.2%
Hidróxido de sodio (NaOH)	0.8N
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	10%

Solución A: mezclar volúmenes iguales de CTC, NaOH y SDS.

Solución B: reactivo de Folin- Ciocalteu – Fenol, 1:6 ( 1 volumen de reactivo + 5 volúmenes de agua desionizada).

Se tomó 1mL de muestra y se adicionó 1 mL de solución A con agitación continua. Se dejó 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se adicionó 0.5 mL de solución B, con agitación continua. Se dejó 30 minutos a temperatura ambiente (para desarrollo de color) y se leyó absorbancia a 750 nm en un espectrofotometro Shimadzu (el color es estable en un intervalo de 30 a 120 minutos).

#### 4.2.2 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Se determinó empleando el método de peso seco.

Se pesaron 10 g de carpa dorada y se colocaron en una charola de aluminio puesta a peso constante previamente. Se colocó la charola en una estufa a 60°C, durante 24 horas. Después se llevó la charola a temperatura ambiente en un desecador y finalmente se tomó el peso de la muestra seca y se obtuvo el porcentaje de humedad con la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{(\text{Peso inicial de la muestra} - \text{Peso final de la muestra})}{\text{Peso inicial de la muestra}} \times 100$$

#### 4.2.3 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HIDRÓLISIS

El grado de hidrólisis se realizó empleando la técnica del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) reportado por Benjakul y Morrisey (1997), la cual determina los grupos  $\alpha$ -amino liberados durante la hidrólisis. Para esta determinación se empleó una curva estándar de L – leucina (Anexo B).

Se tomaron alicuotas de 64  $\mu$ L de cada dilución por duplicado y se colocaron en frascos ámbar de 4mL. Se adicionó 1mL de buffer de fosfatos 0.2 M a pH 8.2 y 0.5 mL de TNBS al 0.05%, con agitación. Posteriormente se colocaron en un baño maría a 50°C, durante 30 minutos; la reacción se detuvo adicionando 1mL de sulfito de sodio 0.1M. Se mantuvieron las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos y se leyó absorbancia a 420 nm.

#### **4.2.4 ELECTROFORESIS**

Se realizó de acuerdo con la técnica de Laemmli, (1970) con un gel de separación al 12% de la mezcla acrilamida bis-acrilamida y un gel de concentración al 4%, empleando un equipo miniprotean BioRad™ (Los reactivos empleados se muestran en el Anexo C).

#### **4.2.5 CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL**

Se realizó una cromatografía de filtración en gel, en un sistema de cromatografía de baja presión (FPLC) Biologic LP, Bio–Rad™. Se empleó un soporte de Sephadex G - 50 y una fase móvil de buffer de fosfatos 0.2 M, pH 6.8 con NaCl 0.15M y azida de sodio 0.01M, para evitar que el soporte se contaminara con las muestras. El flujo de la fase móvil fue de 0.5 mL /min., y se colectaron fracciones de 5 mL para posteriores análisis. Los estándares empleados fueron ovoalbúmina, lisosima y vitamina B<sub>12</sub>, con pesos moleculares de 44, 14.4 y 1.5 KDa respectivamente. El volumen de inyección fue regulado por medio de un “loop” de 1.5 mL.

#### **4.2.6 ULTRAFILTRACION**

La separación de las fracciones del hidrolizado se realizó por ultrafiltración en un ultrafiltro Minitan, Millipore ®, empleando 2 membranas de polisulfona de 6 x 10 cm con tamaño de exclusión de 30 KDa y una área de filtración de 120 cm<sup>2</sup>. Las condiciones de operación del ultrafiltro fueron: presión de entrada de 16 a 18 Psig y flujo de permeado de 2.1 mL min<sup>-1</sup>.

Para establecer el tiempo de permanencia del hidrolizado en el ultrafiltro se evaluó la eficiencia en la separación de las fracciones mediante cromatografía de filtración en gel del retenido a diferentes tiempos hasta obtener una eficiencia de por lo menos 70%.

#### **4.2.7 LIOFILIZACIÓN**

Las muestras fueron liofilizadas en una liofilizadora Labconco Lyph 6®. Se colocaron 250 mL de muestra en un matraz de bola de 1L y se congelaron con una mezcla de hielo seco y acetona. Este tipo de congelación permite la formación de capas delgadas homogéneas dentro del matraz, lo cual hace más eficiente el proceso de liofilización.

#### **4.2.8 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL**

##### **4.2.8.1 SOLUBILIDAD**

La evaluación de la solubilidad de los péptidos obtenidos se realizó empleando la técnica reportada por Parrado et al (1991). Se pesó la cantidad de muestra necesaria para preparar 100 mL de solución de proteína al 1% (p/v), se adicionaron 75 mL de buffer de fosfatos (0.1M) al pH a trabajar (4 a 7) y se ajustó el pH, posteriormente se aforó a 100 mL. Se agitó durante 15 minutos en un agitador orbital y se dejó reposar por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 5,400 x g durante 15 minutos, se determinó el contenido de proteína por el método de Lowry modificado descrito en el inciso 4.2.1.

La solubilidad se reportó como el porcentaje de proteína presente en el sobrenadante tomando como referencia la cantidad de proteína inicial en la suspensión.

#### **4.2.8.2 CAPACIDAD EMULSIFICANTE Y ESTABILIDAD DE EMULSIÓN**

Se evaluó la capacidad emulsificante del hidrolizado y de las fracciones mayor y menor de 30 KDa determinando el índice de actividad emulsificante (IAE) por el método de Pearce y Kinsella (1978). Se pesó la cantidad de muestra necesaria para tener 100 mL de suspensión de proteína al 1% en un matraz erlenmeyer de 250 mL. Se agregaron 75 mL de buffer de fosfatos al pH a trabajar (4 a 7) y se homogeneizó durante 1 minuto con un homogenizador Ultra turrax marca Janke & Kunkel . Posteriormente se ajustó el pH y se aforó a 100 mL con el mismo buffer. Se homogeneizó por dos minutos a 20, 000 rpm y se tomaron 200  $\mu$ L de la emulsión formada y se colocaron en un vaso de precipitados que contenía SDS al 1% con NaCl (a la cual previamente se le eliminaron 200  $\mu$ L de solución), se leyó la absorbancia a 500 nm empleando como blanco la solución de SDS – NaCl.

El resto de la emulsión se vació en tubos de centrifuga para determinar la estabilidad de emulsión según la técnica reportada por Dagorn-Scaviner *et al.*, (1987). Las muestras fueron centrifugadas a 1,350 x g durante 10 minutos y se midió el volumen total en los tubos y el volumen de aceite coalescido. Se reportó la estabilidad de emulsión como el porcentaje de aceite coalescido por la acción física de la centrifugación.

El IAE se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{IAE} = 2TD / QC$$

Donde: T = turbidez = densidad óptica (DO) / Longitud de la celda (cm)  
Q = fracción volúmetrica de la fase dispersa (aceite) = 0.25  
C = concentración de la solución protéica (g /m<sup>3</sup>) = 1  
D = dilución = 250

#### **4.2.8.3 CAPACIDAD ESPUMANTE Y ESTABILIDAD DE ESPUMA**

La capacidad espumante se determinó de acuerdo con la técnica reportada por Deeslie y Cheryan, (1988). Se prepararon 10 mL de suspensiones de proteína al 1% (p/v) de cada muestra, la suspensión se colocó en tubos cónicos graduados y se homogeneizaron con un homogenizador Ultra turrax, Janke & Kunkel durante 10 minutos. Posteriormente, se midió el volumen de espuma formado y los tubos se mantuvieron en un baño a 25°C, durante 30 minutos para posteriormente medir la estabilidad de la espuma formada.

Se reportó la capacidad espumante como el volumen de espuma formado expresado en mL por cada 100mL de suspensión de proteína y la estabilidad de espuma se reportó como el porcentaje de espuma mantenido después de 30 minutos a 25°C.

#### **4.2.9 COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS**

Para evaluar la calidad nutricional se consideró el contenido de aminoácidos como índice de calidad nutricional. Se realizó la determinación del contenido de aminoácidos a los subproductos de carpa dorada, al hidrolizado sin fraccionar, a las fracciones mayor y menor de 30 KDa y el hidrolizado comercial de soya se empleó como referencia. Los análisis se hicieron a partir de las muestras liofilizadas.

El contenido de aminoácidos totales se determinó colocando 25 mg de proteína de cada muestra en una ampolleta de vidrio y se adicionaron 2.5 mL de una solución de HCl 6N, adicionada con fenol al 0.1% y mercaptoetanol al 0.05%. Para determinar triptofano se colocaron 20 mg de proteína en una ampolleta en la que se adicionó 1 mL de ácido metanosulfónico 4M (Rayner, 1985).

Para la determinación cisteína y cistina se preparó una solución de ácido per fórmico con 0.5 mL de peróxido de hidrógeno al 30% y 4.5 mL de ácido fórmico al 88%. La mezcla se dejó en reposo durante 1 hora. Se colocaron 20 mg de proteína y se adicionaron 100  $\mu$ L de la solución de ácido per fórmico previamente preparada, se mantuvieron las ampolletas a 0°C durante 4 horas y posteriormente se adicionaron 2 mL de agua destilada y 2.5 mL de HCl 6N. Las ampolletas se sellaron al vacío y se mantuvieron a 110°C durante 24 horas. La determinación del perfil de aminoácidos se llevó a cabo en un analizador de aminoácidos marca Beckman modelo 6600 (Hirs, 1954).

## **4.3 MÉTODOS EXPERIMENTALES**

### **4.3.1. ACONDICIONAMIENTO**

Los subproductos de carpa dorada (SCD) congelados fueron triturados en un molino y empacados al vacío en bolsas que contenían entre 250 y 300 g, para posteriormente ser almacenado a  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

### **4.3.2 ANÁLISIS DE LA MATERIA PRIMA**

A cada bolsa de subproducto previamente acondicionado se le determinó proteína y humedad. Para determinar el contenido de proteína se pesaron 10 g de SCD y se homogeneizaron con 50 mL de buffer de fosfatos (0.2M, pH 7), se aforó a 100 mL con el mismo buffer, posteriormente se realizó una dilución 20:1000 y se tomó 1mL de esta dilución y se realizó la determinación de acuerdo al método modificado de Lowry – Peterson (1977) descrito en el apartado 4.2.1.

El contenido de humedad se determinó de acuerdo con el método descrito en el apartado 4.2.2.

### **4.3.3 CONDICIONES DE HIDRÓLISIS**

#### **4.3.3.1 CINÉTICA DE FLAVOURZYME™ SOBRE LOS SUBPRODUCTOS DE CARPA DORADA**

Para establecer la cinética de hidrólisis con Flavourzyme™ sobre los subproductos de carpa dorada se llevó a cabo una hidrólisis en un reactor a temperatura constante ( $50^{\circ}\text{C}$ ), en el cual se colocaron 100 g de muestra previamente homogeneizados con buffer de fosfatos (0.2M, pH 7) en una relación sustrato/buffer (S/B) de 40%,. La hidrólisis se realizó de acuerdo a las condiciones reportadas por Sumaya (2000) para la hidrólisis con Flavourzyme™ de subproductos de carpa dorada, las cuales son:  $T = 50^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7$  y concentración de enzima de  $50 \text{ LPU g}^{-1}$  proteína.

Se realizaron dos cinéticas, en la primera se llevó a cabo una filtración de la suspensión de pescado en un tamiz No. 100 previo al proceso de hidrólisis y en la segunda cinética se omitió la etapa de filtración. Para determinar la actividad endógena de las enzimas presentes en el pescado se realizó una cinética con la suspensión de SCD sin filtrar a las mismas condiciones que las cinéticas anteriores.

Durante las cinéticas se tomaron alícuotas de 250  $\mu\text{L}$  y 1 mL a los 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90 y 120 minutos de hidrólisis para determinar el grado de hidrólisis y el perfil de pesos moleculares respectivamente. Las muestras se colocaron en viales con 1 mL de SDS (1%) a 80°C y se incubaron durante 15 minutos a ebullición para inactivar la enzima.

#### **4.3.4 PRODUCCIÓN DEL HIDROLIZADO**

##### **4.3.4.1 HIDRÓLISIS**

La producción del hidrolizado se llevó a cabo en un reactor de 4 L, con agitación y control de temperatura. Se colocó una suspensión de pescado con una relación S/B del 40% y una concentración de enzima de 50 LAPU  $\text{g}^{-1}$ . La hidrólisis se llevó a cabo a 50°C, a pH 7 y durante 15 minutos, la hidrólisis se detuvo por inactivación de la enzima por calor en un baño a ebullición durante 15 minutos. Se tomaron alícuotas de 250  $\mu\text{L}$  y de 2 mL del hidrolizado para determinar el grado de hidrólisis y el perfil de pesos moleculares (las alícuotas se tomaron por duplicado).

El hidrolizado se centrifugó durante 10 minutos a 16,800 x g a 4°C en una centrifuga Beckman J2-M1. Una tercera parte del sobrenadante fue liofilizada, el resto del sobrenadante fue separada en fracciones peptídicas mayores y menores de 30 KDa mediante ultrafiltración. Una vez obtenidas las fracciones, éstas y la muestra de hidrolizado sin fraccionar fueron liofilizadas para su posterior caracterización funcional, nutricional y sensorial.

#### **4.3.5 CARACTERIZACIÓN SENSORIAL**

Para caracterizar sensorialmente las muestras del hidrolizado sin fraccionar, las fracciones mayor y menor de 30 KDa y el hidrolizado comercial de soya se realizó una evaluación del sabor amargo empleando cafeína como referencia (Platting 1984; Maeshashi *et al.*, 1999).

##### **4.3.5.1 SELECCIÓN DEL PANEL**

El panel estuvo integrado por 10 personas seleccionadas a partir de un grupo de 50 personas. El criterio de selección del panel se basó en la capacidad para ordenar muestras de cafeína a diferentes concentraciones y la sensibilidad para detectar la presencia de cafeína en una bebida comercial (en este caso se empleó Gatorade sabor naranja).

##### **4.3.5.2 EVALUACIÓN DEL SABOR AMARGO**

Para la evaluación del sabor amargo en los hidrolizados se realizó una prueba de rango. A los panelistas se les presentaron muestras de cafeína a diferentes concentraciones (0.05, 0.14, 0.18, 0.23 y 0.3 gL<sup>-1</sup>) (Platting, 1984), muestras del hidrolizado sin fraccionar, la fracción mayor de 30 KDa, la fracción menor de 30 KDa y el hidrolizado comercial de soya y agua como control. Las muestras de los hidrolizados se prepararon al 1% (p/v) de acuerdo a lo reportado por Maeshashi *et al.*, (1999). Los panelistas tenían que probar primero las 5 muestras de cafeína y después probar las muestras de los hidrolizados e indicar a que concentración de cafeína correspondía la intensidad del sabor amargo de los hidrolizados probados. El cuestionario empleado en la evaluación sensorial se muestra en el Anexo D.

#### **4.3.5.3 ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

Los resultados fueron analizados mediante una prueba paramétrica de análisis de varianza y la prueba no paramétrica de Friedman empleando el paquete estadístico Number Crunch Statistic System (NCSS).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 5.1 CONTENIDO DE PROTEÍNA Y HUMEDAD DE LA MATERIA PRIMA

El material que se empleó para realizar la producción del hidrolizado es un subproducto del fileteado de pescado por lo que está constituido principalmente por músculo y piel.

El contenido de proteína de SCD se encuentra por arriba del valor reportado para los subproductos de Blanco del Pacífico y para la proteína de Arenque, esto puede deberse a que los SCD están constituidos principalmente por músculo, mientras que los SBP están constituidos por cabeza, piel, espinas, vísceras y tejido muscular (tabla 5.1).

**Tabla 5.1 Contenido de Proteína y humedad de SCD**

	PROTEÍNA (%) B.S	HUMEDAD (%)
Subproductos de Carpa dorada (SCD)	83.98± 0.33	81
Subproductos de Blanco del Pacífico (SBP) <sup>1</sup>	69.36 ± 3.28	N.R
Proteína de Arenque <sup>2</sup>	62.0 ± 0.3	N.R

<sup>1</sup>Benjakul y Morrissey, 1997. <sup>2</sup> Liceaga-Gesualdo y Li- Chan, 1999

## **5.2 CONDICIONES DE HIDRÓLISIS**

La hidrólisis de proteínas con una enzima proteolítica adecuada ofrece la posibilidad de controlar el grado de rompimiento de la proteína. Usando las proporciones de enzima/sustrato y tiempo de reacción adecuados es posible la producción de hidrolizados con diferente tamaño molecular y diferentes propiedades funcionales que podrían encontrar aplicación en varias formulaciones alimenticias (Onodenalore y Shahidi, 1996).

Dentro de los parámetros más importantes que determinan las características de los hidrolizados de proteína se encuentran el grado de hidrólisis (GH), que indica el grado de rompimiento de la proteína y el perfil de pesos moleculares (PPM), el cual permite conocer el rango de peso molecular en el que se encuentran los péptidos presentes en el hidrolizado. El GH por si solo no es de mucha utilidad cuando se busca obtener péptidos de un tamaño molecular específico, lo cual dependerá del tipo de sustrato y de enzima empleados, esto es corroborado con lo reportado por Clemente et al. (1999) quienes encontraron que al realizar una hidrólisis con Flavourzyme™ y Alcalasa™ sobre proteína de garbanzo se obtienen grados de hidrólisis similares (27%); sin embargo, los patrones electroforéticos fueron muy diferentes en ambos casos. A diferencia con lo obtenido con Flavourzyme™ los hidrolizados de Alcalasa™ y Alcalasa™ – Flavourzyme™ no mostraron bandas electroforéticas visibles, lo cual se puede deber a una alta proporción de péptidos pequeños y aminoácidos libres. De acuerdo con esto, los criterios empleados en este trabajo para establecer las condiciones de hidrólisis fueron el grado de hidrólisis (GH) y el perfil de pesos moleculares (PPM).

Para establecer el tiempo de hidrólisis para obtener el hidrolizado de subproductos de carpa se realizaron dos cinéticas para medir la acción de Flavourzyme™ sobre los subproductos de carpa dorada (*Carassius auratus*) a las condiciones de hidrólisis óptimas reportadas por Sumaya (2000). Dichas condiciones fueron: S/B = 40%, T= 50°C, pH 7 y [E] = 50 LAPU g<sup>-1</sup> proteína. Las cinéticas se realizaron en un reactor con agitación y temperatura controlada. Para lo cual se homogeneizó una muestra de carpa dorada con buffer de fosfatos 0.2 M a pH 7, la primer cinética se realizó filtrando la suspensión de pescado previamente a la hidrólisis; la segunda se realizó sin filtrar la suspensión.

### **5.2.1 PERFIL DE PESOS MOLECULARES (PPM)**

El perfil de pesos moleculares de las dos suspensiones de carpa empleadas en las cinéticas (filtrada y sin filtrar) fue determinado por cromatografía de filtración en gel empleando una columna de Sephadex G-50. En la figura 5.1 se puede observar que la distribución de pesos moleculares de ambas suspensiones presentan un rango de pesos moleculares similar que va de 44 KDa a menores de 1.5 KDa. Sin embargo se observa una variación en la proporción de los péptidos obtenidos, ya que en la suspensión sin filtrar se observa la presencia de péptidos de alto (> 30 KDa), mediano (10 – 30 KDa) y bajo (< 10 KDa) peso molecular mientras que en la suspensión filtrada el mayor porcentaje corresponde a péptidos de bajo peso molecular (< 10 KDa), lo cual no es deseable debido a que estos péptidos pequeños serían rápidamente hidrolizados a aminoácidos libres los cuales son responsables de características funcionales y sensoriales indeseables (Hoyle y Merrit, 1994).

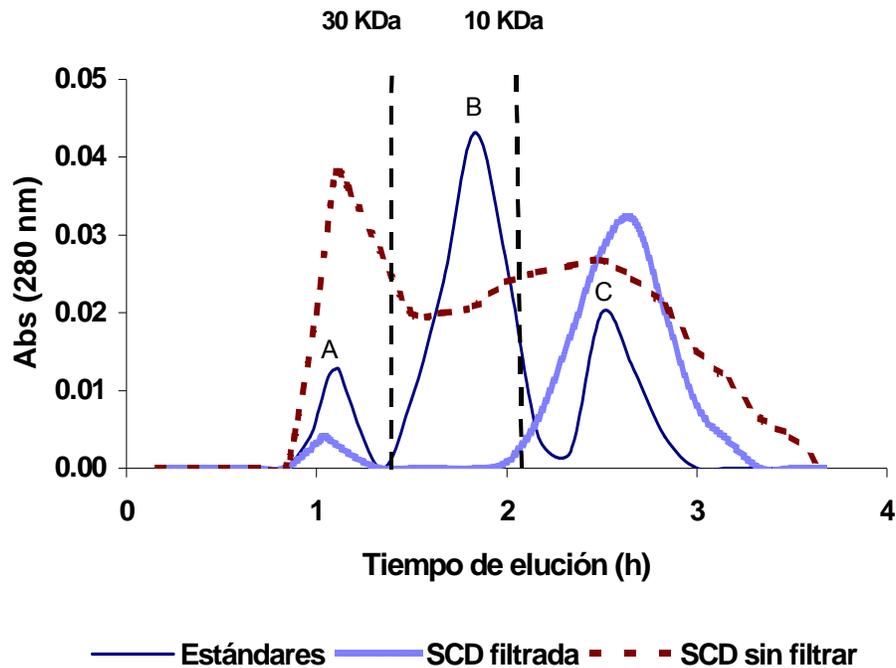


Figura 5.1. Cromatogramas de las suspensiones de subproductos de carpa dorada (filtrada y sin filtrar) realizados por filtración en gel empleando Sephadex G-50, con fase móvil de buffer de fosfatos 0.2 M (pH 6.8). Los marcadores empleados fueron: A) ovoalbúmina (44 KDa), B) lisosima (14.4 KDa), C) vitamina B<sub>12</sub>. (1.5 KDa)

### 5.2.2 GRADO DE HIDRÓLISIS

Se determinó el GH sobre las muestras de las dos cinéticas realizadas con la suspensión de SCD filtrada y sin filtrar. En la figura 5.2 se observa que durante los primeros 60 minutos las cinéticas de las dos suspensiones de pescado (filtrada y sin filtrar) presentan un comportamiento muy similar en donde se aprecia que la velocidad de hidrólisis en esa etapa es lineal con respecto al tiempo. Posteriormente la velocidad de hidrólisis en la suspensión filtrada decrece a mayor velocidad que la de la curva de la suspensión sin filtrar.

Esto probablemente se debe a que en la suspensión filtrada ya se ha liberado una gran cantidad de péptidos lo que dificulta la acción de la enzima por inhibición de los productos de hidrólisis (Whitaker, 1972; Rebeca *et al.*, 1991; Mullally *et al.*, 1995; Linder *et al.*, 1996). Esto concuerda con lo reportado por Shahidi *et al.* (1995) quienes encontraron que una alta concentración de péptidos solubles en la mezcla de reacción, liberados durante la fase inicial de hidrólisis reduce tanto la velocidad de hidrólisis como la recuperación de proteínas solubles. Esto no ocurre con la suspensión no filtrada ya que al encontrarse presentes fracciones de mayor peso molecular la cantidad de péptidos solubles liberados es menor, porque la proteína no se encuentra tan expuesta como en la suspensión filtrada.

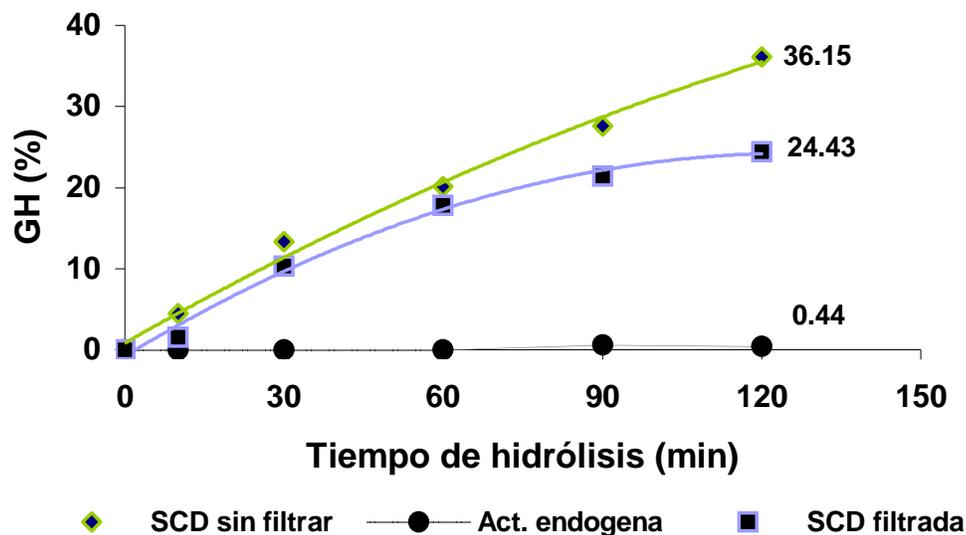


Figura 5.2. Cinética de Flavourzyme™ sobre subproductos de carpa dorada (*Carassius auratus*) a S/B = 40%, T=50°C, pH = 7, [E] = 50 LAPU g<sup>-1</sup> proteína.

Las curvas obtenidas son similares a las reportadas por Clemente *et al* (1999) quienes encontraron que la acción de Flavourzyme sobre aislado de proteína de garbanzo presenta una fase de aceleración hasta los 120 minutos, después de este tiempo la velocidad de hidrólisis se vuelve constante. Ellos obtuvieron un grado de hidrólisis de 25% en 120 minutos, mientras que para los subproductos de carpa dorada se obtuvo un GH de 24 y 36% para la cinética de la suspensión filtrada y sin filtrar respectivamente para los mismos tiempos de hidrólisis. Así mismo resultados similares fueron reportados por Benjakul y Morrisey (1997), quienes encontraron que al mismo nivel de enzima, Alcalasa mostró una actividad hidrolítica más alta que Neutrasa, medido en términos de grado de hidrólisis determinado por los grupos amino liberados. Ellos obtuvieron una rápida velocidad de reacción en los primeros 10 minutos. Posteriormente, la velocidad de reacción decreció. Una curva similar fue reportada para la hidrólisis enzimática de subproductos de langostino (Baek y Cadwallader, 1995), capelin (Shahidi *et al.*, 1995), sardina (Quaglia y Orban, 1987) y hueso de ternera (Linder *et al.*, 1996) caracterizados por una fase inicial rápida, después la velocidad de hidrólisis decrece y llega a una etapa estacionaria donde aparentemente la hidrólisis ya no toma lugar.

De acuerdo al perfil de pesos moleculares y a los grados de hidrólisis obtenidos para ambas cinéticas en este trabajo se decidió llevar a cabo la hidrólisis de los subproductos de carpa dorada sin filtrar la suspensión de proteína antes de realizar la hidrólisis, por lo que se realizó una tercer cinética para medir la actividad de las enzimas endógenas presentes en el sustrato.

La cinética de la actividad endógena se muestra en la figura 5.2, el grado de hidrólisis por estas enzimas es de apenas el 0.44% a los 120 minutos de hidrólisis, lo cual es prácticamente despreciable por lo que se puede considerar que la hidrólisis se debe únicamente a la acción de Flavourzyme™.

### **5.2.3 PERFIL DE PESOS MOLECULARES POR ELECTROFORESIS SDS – PAGE**

De la cinética de reacción de Flavourzyme™ sobre la suspensión de subproductos de carpa dorada sin filtrar se determinó el peso molecular por electroforesis SDS-PAGE (Laemmli,1970); y de esta manera establecer el tiempo de hidrólisis que presentase una distribución de pesos moleculares que nos permitiera obtener péptidos de alto y bajo peso molecular. En la figura 5.3 se muestra el perfil electroforético de los hidrolizados de subproductos de carpa dorada a diferentes tiempos de hidrólisis (0 - 30 minutos). A partir de los 10 minutos se observa la desaparición de las dos primeras bandas de mayor peso molecular (205 y 79 KDa) que se observan al tiempo cero. A los 15 minutos se observa la presencia de bandas en un rango de pesos moleculares de aproximadamente 40 KDa y menores de 6.6 KDa que corresponden a péptidos de alto y bajo peso molecular. Posteriormente, a los 20 minutos se reduce considerablemente la proporción de péptidos de alto peso molecular (40 KDa aproximadamente) mientras que se incrementa la fracción de péptidos de bajo peso molecular (menores a 6.6 KDa).

A un menor tiempo de hidrólisis (10 minutos) se obtienen péptidos de alto y bajo peso molecular; sin embargo, el porcentaje de nitrógeno recuperado (%NR, que refleja el rendimiento de nitrógeno que puede ser recuperado mediante el proceso de hidrólisis) bajo de acuerdo con lo reportado por Benjakul y Morrissey (1997) sobre Blanco del Pacífico y posteriormente, por Sumaya (2000) sobre subproductos de carpa dorada. Asimismo ellos encontraron que el %GH está altamente correlacionado con el %NR, de esta manera a menor grado de hidrólisis el nitrógeno recuperado es menor. Por otro lado, a un mayor tiempo de hidrólisis (20 minutos) la cantidad de nitrógeno recuperado es mayor y el perfil de pesos moleculares muestra que a mayor tiempo de hidrólisis la fracción mayor de 30 KDa se reduce casi en su totalidad.

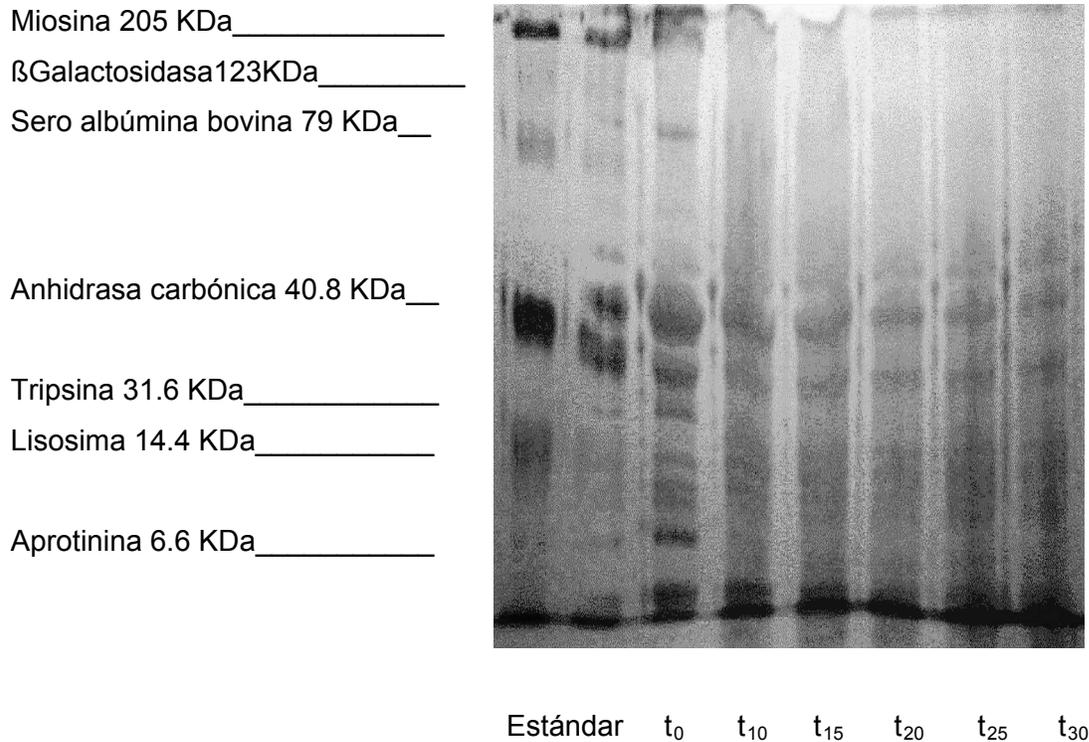


Figura 5. 3. Electroforesis SDS – PAGE del hidrolizado de subproductos de carpa dorada a diferentes tiempos de hidrólisis (0 –30 minutos). S/B =40%, T= 50 °C, pH= 7, [E]= 50 LAPU g<sup>-1</sup> proteína.

Además, un grado de hidrólisis excesivo puede generar un alto contenido de aminoácidos libres, lo que puede traer como consecuencia propiedades funcionales pobres y características sensoriales indeseables (Hoyle y Merrit, 1994). En este trabajo se busca obtener fracciones peptídicas en rangos de alto y bajo peso molecular para evaluar el efecto del tamaño molecular sobre las propiedades funcionales, tratando al mismo tiempo de recuperar la mayor cantidad de proteína posible. De acuerdo con el perfil electroforético obtenido en la cinética se decidió realizar la producción del hidrolizado a un tiempo de hidrólisis de 15 minutos ya que a este tiempo se obtiene un perfil de pesos moleculares que nos permite caracterizar péptidos de alto (> 30KDa ) y bajo (< 10 KDa) peso molecular.

### **5.3 HIDRÓLISIS DE LOS SUBPRODUCTOS DE CARPA DORADA**

La hidrólisis de los subproductos de carpa dorada se llevó a cabo en un reactor con agitación y temperatura controlada, el cual estaba provisto de un electrodo que permitió monitorear el pH durante la hidrólisis. Las condiciones de la hidrólisis fueron: S/B = 40%, T = 50°C, pH = 7, [E] = 50 LAPU g<sup>-1</sup> proteína y t = 15 minutos. La hidrólisis se detuvo por inactivación de la enzima en un baño a ebullición durante 15 minutos, después de este tiempo el hidrolizado se centrifugó a 4°C a 16, 800 x g durante 10 minutos. Se eliminó la parte sedimentada y se trabajó con la parte soluble del hidrolizado.

El hidrolizado obtenido presentó un GH de 11% determinado por  $\alpha$ -amino terminales (TNBS) además, se determinó el perfil de pesos moleculares por cromatografía de filtración en gel empleando una columna de Sephadex G-50. La figura 5.4 muestra que el hidrolizado contiene péptidos que van de menores a 1.5 KDa hasta 44 KDa, de acuerdo con este perfil se realizó la separación por ultrafiltración de fracciones peptídicas mayores y menores de 30 KDa.

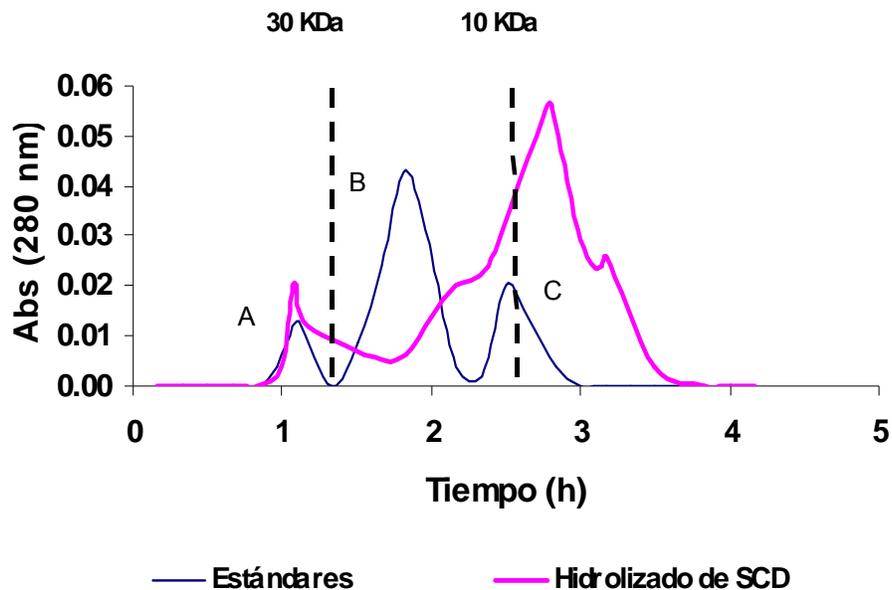


Figura 5.4. Cromatograma del hidrolizado de subproductos de carpa dorada. Cromatografía realizada por filtración en gel sobre Sephadex G-50, se emplearon como marcadores: A) ovoalbúmina (44 KDa), B) lisosima (14.4 KDa) y C) vitamina B<sub>12</sub> (1.5 KDa).

## 5.4 SEPARACIÓN DE PÉPTIDOS POR ULTRAFILTRACIÓN

El tamaño molecular de las proteínas hidrolizadas es un factor clave en la producción de hidrolizados con propiedades funcionales deseables. Uno de los métodos para controlar el tamaño molecular es el uso de ultrafiltración (Cheryan y Mehaia, 1990). Para establecer las condiciones para la separación de las fracciones se realizaron varias pruebas con la fracción soluble. Se pasó la muestra a través de un ultrafiltro Minitan™ con dos membranas de polisulfona con tamaño de corte de 30 KDa. Para evitar una posible contaminación microbiana tanto el retenido como el filtrado se mantuvieron en un baño de hielo durante todo el proceso.

#### **5.4.1 EFICIENCIA EN LA SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES PEPTIDICAS**

Una primer prueba consistió en hacer pasar el hidrolizado por el ultrafiltro hasta que el volumen del retenido se redujo al 10% del volumen inicial. En esta primer prueba se observó que el retentado aún contenía un alto porcentaje de péptidos menores de 30 KDa (fig. 5.5).

Para mejorar la eficiencia en la separación de las fracciones se realizaron 7 diafiltraciones discontinuas empleando como eluyente 100 mL de buffer de fosfatos (0.2 M, pH 7). La diafiltración tiene como finalidad eliminar las partículas más pequeñas para lograr una mejor separación de las moléculas más grandes de 30 KDa (Tejeda *et al.*, 1995). Se tomó una muestra del retenido cada vez que el volumen adicionado era colectado en el filtrado, estas muestras fueron analizadas por cromatografía de filtración en gel para establecer cual era el número de diafiltraciones necesario para obtener una buena separación de las fracciones. En la figura 5.5 se presentan los perfiles de pesos moleculares del filtrado sin diafiltración (primer prueba), de la cuarta y séptima diafiltración, en la que se puede observar que en la séptima diafiltración ya se ha logrado una separación del 70% de la fracción mayor de 30 KDa.

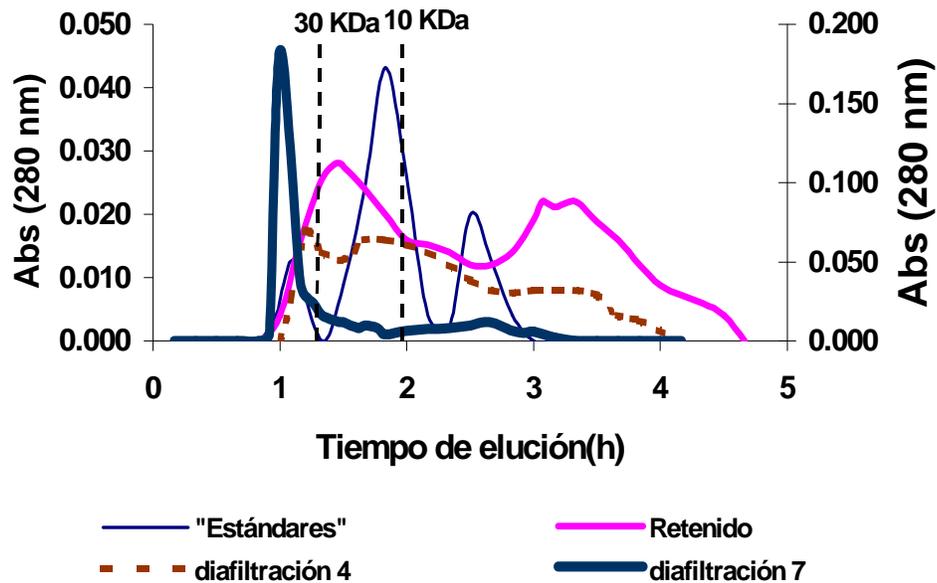


Figura 5.5 Cromatograma del retenido ( $F > 30$  KDa), 4<sup>a</sup> y 7<sup>a</sup> diafiltración. Cromatografía realizada por filtración en gel sobre Sephadex G-50, se emplearon como marcadores: 1) ovoalbúmina (PM= 44 KDa), 2) lisosima (PM=14.4 KDa), 3) vitamina B<sub>12</sub> (PM=1.5 KDa).

## 5.5 RENDIMIENTO

Para determinar el rendimiento del hidrolizado se juntaron las cantidades obtenidas del hidrolizado sin fraccionar y de las fracciones mayor y menor de 30 KDa liofilizadas y se tomó como 100% la cantidad de SCD húmedo empleado en la producción del hidrolizado. En la tabla 5.2 se presentan las cantidades obtenidas para cada fracción así como el contenido de proteína de cada muestra.

**Tabla 5.2 Rendimiento y contenido de proteína del HSCD y sus fracciones**

MUESTRA	RENDIMIENTO % (p/p)	PROTEÍNA % (B. S.)
HSCD (sin fraccionar) <sup>1</sup>	7.54 ± 0.40	88.5
Fracción > 30 KDa <sup>2</sup>	19.28 ± 0.09	79.0
Fracción < 30 KDa <sup>2</sup>	80.73 ± 0.09	69.5

<sup>1</sup> Rendimiento del hidrolizado considerando también las fracciones. <sup>2</sup> Rendimiento considerado a partir del hidrolizado sin fraccionar.

El rendimiento del HSCD se encuentra ligeramente por arriba de los valores reportados para hidrolizados de proteína de Arenque, los cuales fueron 6.6% empleando Alcalasa™ (Liceaga-Gesualdo y Li-Chan, 1999) y 3.6 a 5.5% para los hidrolizados obtenidos por tratamiento con Alcalasa™ de filetes de Arenque crudo molido y Arenque desgrasado por extracción con etanol, cocimiento y prensado respectivamente (Hoyle y Merrit, 1994). El contenido de proteína del hidrolizado y de la fracción mayor de 30 KDa se encuentra dentro de los valores reportados para otros hidrolizados, los cuales han sido 77% para proteína de Arenque y 92% para subproductos de Blanco del Pacífico (Liceaga-Gesualdo y Li-Chan, 1999; Benjakul y Morrissey, 1997). El contenido de proteína obtenido para la fracción menor de 30 KDa es más bajo que el valor obtenido para fracción mayor de 30 KDa debido a que la fracción menor de 30 KDa no se sometió a una etapa de desalinización para eliminar las sales de fosfatos presentes en el filtrado provenientes del buffer de fosfatos que se emplearon en las diafiltraciones realizadas durante la ultrafiltración para mejorar la eficiencia en la separación de las fracciones.

En esta primera etapa se ha logrado la obtención de un hidrolizado de subproductos de carpa dorada que contiene fracciones peptídicas de alto y bajo peso molecular con rendimiento y contenido de proteína comparables con los obtenidos en otros hidrolizados, una segunda etapa consistió en la evaluación de las propiedades funcionales del hidrolizado y las fracciones obtenidas.

## **5.6 CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL**

Las propiedades funcionales de las proteínas y en particular de los hidrolizados de proteína se encuentran fuertemente influenciadas por el tamaño molecular de los péptidos que los conforman, además existen otros factores como el pH y la concentración de la proteína que afectan el comportamiento de estos péptidos. Para la evaluación funcional se prepararon soluciones de proteína al 1% de las muestras liofilizadas del hidrolizado sin fraccionar, de las fracciones mayor y menor de 30 KDa (fraccionadas previamente por ultrafiltración) y de un hidrolizado comercial de soya empleado como referencia.

Se determinó solubilidad, capacidad emulsificante y capacidad espumante a valores de pH de 4, 5, 6 y 7; esto debido a que la mayoría de las formulaciones alimenticias donde podrían ser empleados se encuentran en ese intervalo de pH.

Debido a que el peso molecular es un factor importante en la funcionalidad de los hidrolizados, en la figura 5.6 se presentan los perfiles de peso molecular del hidrolizado sin fraccionar y del hidrolizado comercial de soya. El hidrolizado sin fraccionar presenta péptidos mayores y menores de 30 KDa, mientras que el hidrolizado de soya sólo contiene péptidos menores de 30 KDa. La determinación de los perfiles de peso molecular servirán más adelante para discutir los resultados de la caracterización funcional.

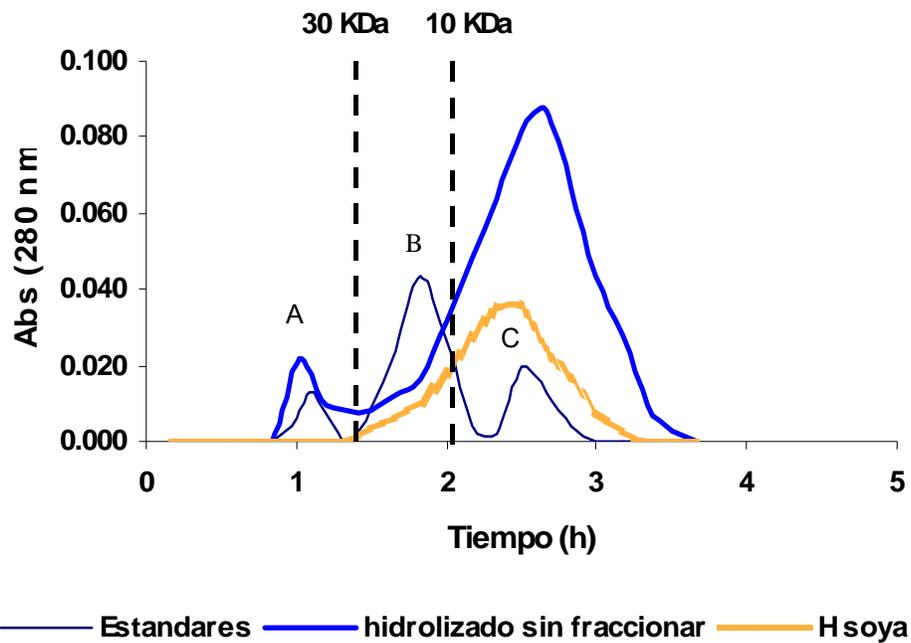


Figura 5.6 Perfil de pesos moleculares del hidrolizado sin fraccionar y del hidrolizado comercial de soya. Cromatografía realizada por filtración en gel sobre sephadex G-50, se emplearon como marcadores :A) ovoalbúmina (44 KDa), B) lisosima (14.4 KDa) y C) vitamina B<sub>12</sub> (1.5 KDa).

### 5.6.1 SOLUBILIDAD

La solubilidad es una propiedad funcional muy importante de las proteínas de alimentos porque otras propiedades funcionales (por ejemplo: emulsificación, gelación y espumado) dependen de la solubilidad inicial de la proteína particular y además la solubilidad es un excelente indicador de la funcionalidad de los hidrolizados de proteína y de su posible uso en aplicaciones alimenticias (Mahmoud, 1994).

Se evaluó la solubilidad del hidrolizado de subproductos de carpa dorada sin fraccionar, de las fracciones mayor y menor de 30 KDa y de un hidrolizado comercial de soya por el método reportado por Parrado *et al.*, (1991). Se presentan los valores promedio de tres determinaciones realizadas por triplicado. Se realizó un análisis de varianza para establecer si existía diferencia significativa por efecto del pH y entre las diferentes muestras a los diferentes valores de pH. También se realizaron comparaciones múltiples con la prueba de Tukey, por medio del paquete estadístico SPSS.

En la figura 5.7 se muestran los niveles de solubilización obtenidos, la mayoría de las muestras presentaron una solubilidad mínima de 80% a todos los valores de pH probados. Sin embargo, el hidrolizado sin fraccionar presentó una solubilidad significativamente inferior ( $p < 0.005$ ) a pH 5, la cual fue de 67.5%. Esto se puede deber a que aún conserva las características del sustrato original, el cual presenta baja solubilidad cerca de su punto isoeléctrico (pH 5.5). Resultados similares fueron reportados por Vieira *et al.*, (1995) quienes encontraron que hidrolizados realizados con agua del procesamiento de langosta empleando pepsina, papaina y una proteasa fúngica presentaron baja solubilidad a pH 5, valor cercano al punto isoeléctrico de la proteína y al cual ésta precipita. Por otro lado Kristinsson y Rasco (2000b) encontraron que la solubilidad de los hidrolizados de salmón del Atlántico a diferentes grados de hidrólisis (5,10,15%) fue mucho más alta a pH 7, la cual fue mayor de 90% en todos los casos.

El hidrolizado de carpa dorada sin fraccionar y las fracciones mayor y menor de 30 KDa mostraron una solubilidad similar a la del músculo de Arenque hidrolizado con Alcalasa y Papaina (Hoyle y Merrit, 1995) y a la del músculo de sardina hidrolizada también con Alcalasa (Quaglia y Orban, 1987), siendo en todos los casos superior a 80%.

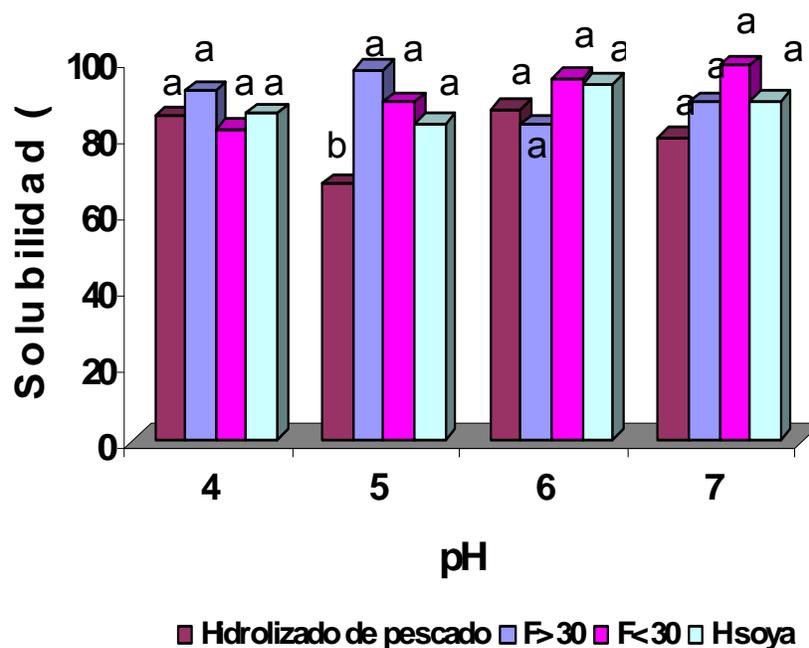


Figura 5.7 Solubilidad (%) del hidrolizado de subproductos de carpa dorada, las fracciones mayor y menor de 30 KDa y un hidrolizado comercial de soya a diferentes valores de pH. Letras diferentes implica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

El que el hidrolizado y sus fracciones presenten buena solubilidad los hace buenos candidatos para su uso en bebidas con alto contenido de proteína y en productos que requieren propiedades emulsificantes y espumantes, debido a que estas propiedades son afectadas por la solubilidad y ésta es un excelente indicador de la funcionalidad y regula el potencial o limitantes en su uso en la industria de alimentos (Kinsella, 1976; Mahmoud, 1994).

### **5.6.2 ÍNDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE (IAE) Y ESTABILIDAD DE EMULSIÓN**

Las propiedades de emulsificación de las proteínas juegan un papel importante en diversas aplicaciones en alimentos. Varios factores y condiciones influyen en las propiedades de emulsificación, estos incluyen: característica estructural y química, por ejemplo el contenido y arreglo de los aminoácidos, peso molecular, regiones hidrofóbicas y condiciones que prevalecen en el medio (temperatura, pH y efectos iónicos) (Kinsella, 1979; Parker, 1987).

Para evaluar la capacidad emulsificante se determinó el índice de actividad emulsificante (IAE) por el método de Pearce y Kinsella, (1978) y la estabilidad de emulsión empleando la metodología reportada por Dagorn-Scaviner *et al* (1987). Los resultados mostrados son los valores promedio obtenidos de determinaciones realizadas dos veces por sextuplicado.

Se realizó un análisis de varianza para establecer si existía diferencia significativa por efecto del pH y entre las diferentes muestras a cada pH. También se realizaron comparaciones múltiples con la prueba de Tukey, por medio del paquete estadístico SPSS.

En la figura 5.8 se presentan los valores de IAE obtenidos para el hidrolizado de SCD sin fraccionar, las fracciones mayor y menor de 30 KDa y el hidrolizado comercial de soya, donde se aprecia que el valor de IAE en el hidrolizado sin fraccionar decreció significativamente ( $p < 0.05$ ) de manera gradual conforme el pH fue incrementado. La fracción mayor de 30 KDa reduce paulatinamente su IAE al incrementar el pH excepto a pH 5 que muestra su valor más alto de IAE ( $22 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ), el cual es comparable con el valor de IAE obtenido para  $\beta$ -lactoglobulina ( $27 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) por Shimidzu *et al* (1986) al mismo valor de pH.

Un comportamiento similar fue reportado por Turgeon *et al* (1992) quienes observaron que la capacidad emulsificante de un concentrado de trigo hidrolizado con tripsina decreció gradualmente al aumentar el pH de 3 a 9.

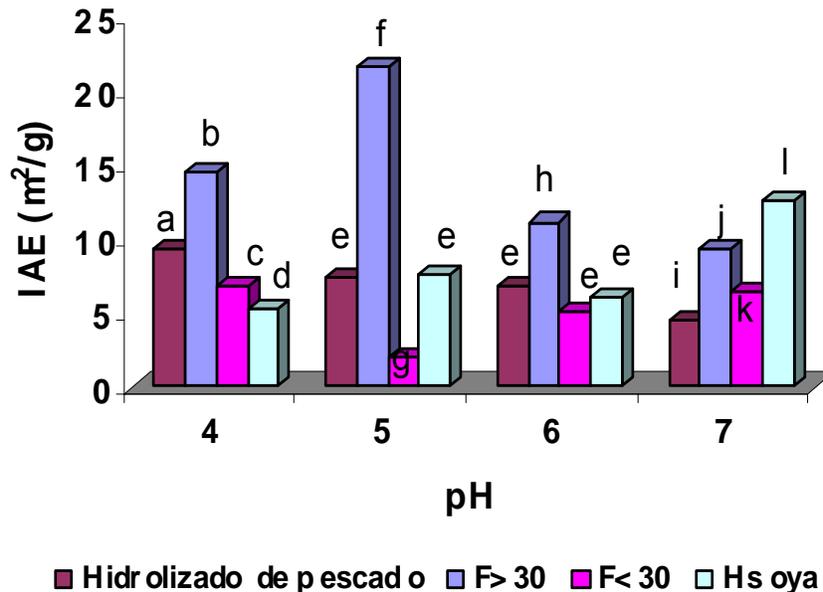


Figura 5.8 Índice de actividad emulsificante (IAE) del hidrolizado de subproductos de carpa dorada, las fracciones mayor y menor de 30 KDa y un hidrolizado comercial de soya a diferentes valores de pH. Letras diferentes implica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

El hidrolizado sin fraccionar presenta valores de IAE similares al hidrolizado comercial de soya a los valores de pH de 5 y 6, este último presentó un valor significativamente más alto a pH 7. Así mismo, se aprecia el incremento en el IAE de la fracción mayor de 30 KDa con respecto al hidrolizado sin fraccionar, esto se debe a que al eliminar los péptidos de bajo peso molecular esta fracción puede formar mejores redes micelares ya que posee el tamaño y la estructura necesarias para la formación de una buena emulsión (Pomeranz, 1991). Además, la fracción mayor de 30 KDa posee un buen tamaño molecular para la formación de emulsiones de acuerdo con lo reportado por Lee *et al* (1987) quienes postularon que los péptidos deberían tener una longitud de cadena mayor de 20 aminoácidos para tener buenas propiedades emulsificantes.

La fracción menor de 30 KDa presenta el valor de IAE más bajo a pH 5. Sin embargo, no presenta diferencia significativa a los otros valores de pH (4,6 y 7) manteniendo su valor entre 5 y 10 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>. A pH 7 se obtuvo un valor de IAE más alto que el hidrolizado sin fraccionar. Las bajas actividades emulsificantes observadas tanto en la fracción menor de 30 KDa así como en el hidrolizado comercial se debe a que están formados sólo por péptidos de bajo peso molecular (< 1.5 KDa) de acuerdo con el perfil de pesos moleculares mostrado en la figura 5.10. Por lo que estas muestras carecen de la estructura necesaria para formar una buena red micelar. Esto concuerda con lo reportado por Turgeon *et al* (1991) quien encontró que los péptidos pequeños difunden rápidamente se absorben en la interfase y son menos eficientes en reducir la tensión superficial porque estos no pueden desdoblarse y reorientarse en la interfase como las proteínas o hidrolizados con alto peso molecular provocando que las emulsiones formadas sean pobres, tal como ya se había señalado anteriormente.

En la figura 5.9 se presenta la estabilidad de emulsión expresada como el porcentaje de aceite coalescido, es decir la cantidad de aceite que se libera de la emulsión al someter ésta a una fuerza física (centrifugación en la técnica empleada). Se puede observar (fig. 5.9) que el hidrolizado sin fraccionar presenta una estabilidad de emulsión superior al 70% a valores de pH de 4, 5 y 6, mientras que a pH 7 presenta 50% de estabilidad. La fracción mayor de 30 KDa presenta valores de estabilidad cercanos al 100% a todos los valores de pH probados. Por otro lado la fracción menor de 30 KDa presenta estabilidad del 50% a pH 4 y 7, mientras que a pH 5 y 6, su estabilidad es inferior al 20%. El hidrolizado comercial de soya presenta el máximo valor de estabilidad a pH 6, el cual fue superior al 70%, mientras que a valores de pH de 4 y 5 presentó un valor de estabilidad cercano al 50%, presentando su valor de estabilidad más bajo a pH 7. Los altos valores de estabilidad de emulsión presentados por la fracción mayor de 30 KDa (> 90%) se deben a que la red micelar de la emulsión formada con esta muestra posee la fuerza necesaria para retener más del 90% del aceite atrapado en la red micelar.

Lo anterior se traduce en una alta estabilidad emulsificante que puede ser atribuida al incremento en la proporción de péptidos de alto peso molecular al eliminar del hidrolizado de SCD la fracción de péptidos de menor peso molecular (menores de 30 KDa) (Samson *et al.*, 1998).

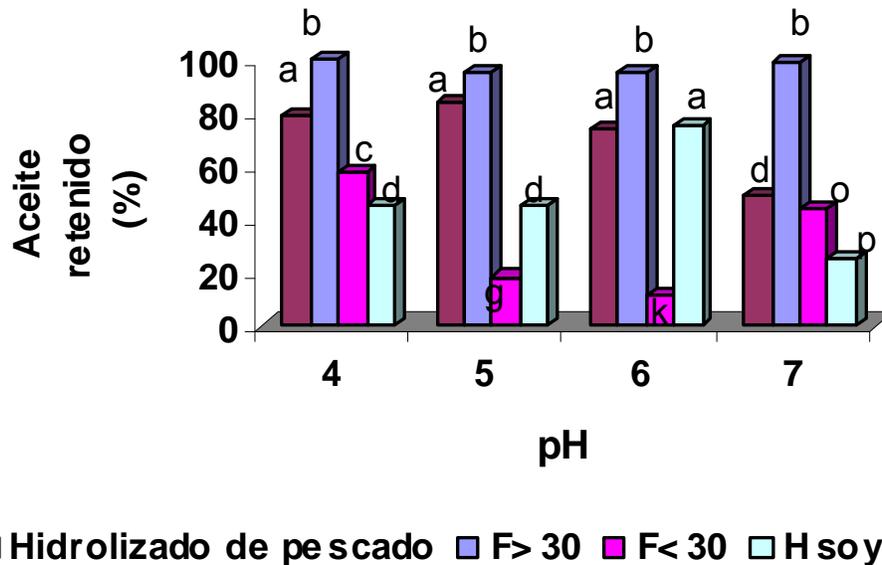


Figura 5.9 Estabilidad de emulsión expresada como porcentaje de aceite retenido del hidrolizado de subproductos de carpa dorada, las fracciones mayor y menor de 30KDa y un hidrolizado comercial de soya a diferentes valores de pH. Letras diferentes implica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Los valores de IAE presentados por la fracción menor de 30 KDa y el hidrolizado comercial de soya concuerdan con otros estudios que han demostrado que los péptidos de bajo peso molecular (<10 KDa) tienen menor capacidad emulsificante y como consecuencia baja estabilidad de emulsión debido a la reducida hidrofobicidad superficial (Kato y Nakai, 1980; Li-Chan *et al.*, 1984; Quaglia y Orban, 1990; Mahmoud *et al.*, 1992; Cui, 1996).

El hidrolizado sin fraccionar y la fracción mayor de 30 KDa presentaron buenas propiedades emulsificantes por lo que estos podrían ser empleados como agentes emulsificantes en productos de repostería y panificación.

### **5.6.3 CAPACIDAD ESPUMANTE Y ESTABILIDAD DE ESPUMA**

La capacidad espumante (medida como el volumen de espuma formada y usualmente expresada como por ciento de sobre- volumen) y la estabilidad (la cual se mide como el tiempo que tarda en colapsarse la espuma) son dos de las características comunes de las espumas. La concentración de la proteína, fuerza iónica, pH, temperatura y la presencia de otros componentes (azúcares, lípidos, alcoholes, etc.) en sistemas de alimentos en adición de las propiedades fisicoquímicas de la proteína afectan las propiedades espumantes de las proteínas (Morr,1985; Maubois *et al.*, 1987).

Se determinó la capacidad espumante y la estabilidad de espuma a las muestras del hidrolizado sin fraccionar, de las fracciones mayor y menor de 30 KDa y del hidrolizado comercial, de acuerdo con la técnica reportada por Deeslie y Cheryan (1988). Los resultados que se presentan son los valores promedio obtenidos de 3 determinaciones realizadas por triplicado.

Se realizó un análisis de varianza para establecer si existía diferencia significativa por efecto del pH y entre las diferentes muestras a cada pH. También se realizaron comparaciones múltiples con la prueba de Tukey, por medio del paquete estadístico SPSS.

En la figura 5.10 se muestra la capacidad espumante (expresada como los mL de espuma formada por cada 100 mL de suspensión proteica) del hidrolizado de pescado sin fraccionar, de las fracciones mayor y menor de 30 KDa y del hidrolizado de soya empleado como referencia. El hidrolizado sin fraccionar presentó valores de capacidad espumante de 170 mL espuma/100 mL de suspensión a pH 4 y 5, a pH 6 fue de 120 mL espuma / 100 mL de suspensión, mientras que a pH 7 la capacidad espumante decreció hasta 30 mL espuma / 100 mL de suspensión.

La fracción mayor de 30 KDa presentó valores de capacidad espumante alrededor de 150 mL espuma / 100 mL de suspensión a todos los valores de pH probados. Para la fracción menor de 30 KDa se obtuvieron valores de capacidad espumante de 130 mL espuma / 100 mL de suspensión a pH 4 y menores de 30 mL espuma / 100 mL de suspensión a valores de pH de 5, 6 y 7. El hidrolizado comercial de soya sólo presentó capacidad espumante a pH 4, la cual fue de 30 mL espuma / 100 mL de suspensión.

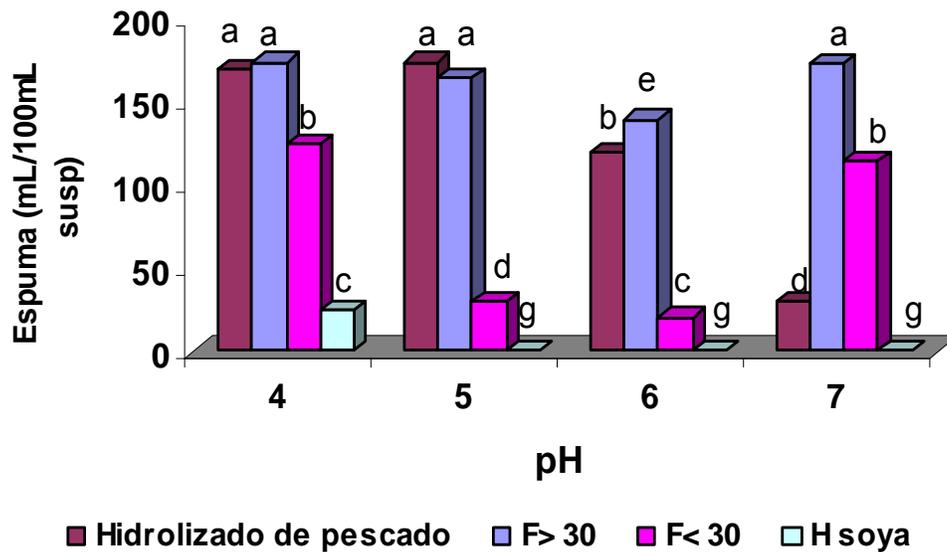


Figura 5.10 Capacidad espumante del hidrolizado de subproductos de carpa dorada, las fracciones mayor y menor de 30 KDa y un hidrolizado comercial de soya a diferentes valores de pH. Letras diferentes implica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Los valores de capacidad espumante de la fracción mayor de 30 KDa a pH 4, 5, 6 y 7, y del hidrolizado sin fraccionar a pH 4 y 5 son superiores al valor reportado para ovoalbúmina, el cual es de 140 mL espuma / 100 mL de suspensión (Jara, 1997). Por otro lado los valores obtenidos para la fracción menor de 30 KDa a pH 4 y 7 son similares al valor reportado por Ahmedna *et al* (1999) para aislado de trigo (135 mL espuma / 100 mL de suspensión) y están ligeramente por debajo del reportado para ovoalbúmina que es una proteína empleada como estándar de capacidad espumante.

La falta de capacidad espumante en el hidrolizado comercial de soya puede deberse a que sólo presenta péptidos de bajo peso molecular como se mostró en el perfil de pesos moleculares presentado en la figura 5.6, esto concuerda con lo reportado por Phillips *et al* (1994) quienes encontraron que las características estructurales de las proteínas tales como peso molecular, contribuyen a la rápida formación de la espuma, pero éstas pueden no ser ideales en la formación de las interacciones proteína- proteína que dan origen a espumas estables.

En la figura 5.11 se presenta la estabilidad de espuma reportada como el porcentaje de espuma que se conserva después de mantener la muestra a 25°C durante 30 minutos. Se observa que el hidrolizado sin fraccionar presentó una estabilidad de espuma alrededor de 50% a pH 4, a pH 5 y 6 la estabilidad fue de 30 y 20% respectivamente, mientras que a pH 7 presentó la máxima estabilidad la cual fue superior a 60%. La fracción mayor de 30 KDa presentó su máximo valor de estabilidad de espuma a pH 4 siendo de 30% mientras que a pH 5, 6 y 7 la estabilidad fue de 20%. Por el contrario la fracción menor de 30 KDa presentó valores de estabilidad de espuma de 40 y 50% a pH 4 y 6 respectivamente, y valores de 30 y 20 a pH de 5 y 7. El hidrolizado de soya no presentó estabilidad de espuma a pH 4 que es el único valor de pH al que presentó capacidad espumante ya que la espuma formada se perdía instantáneamente.

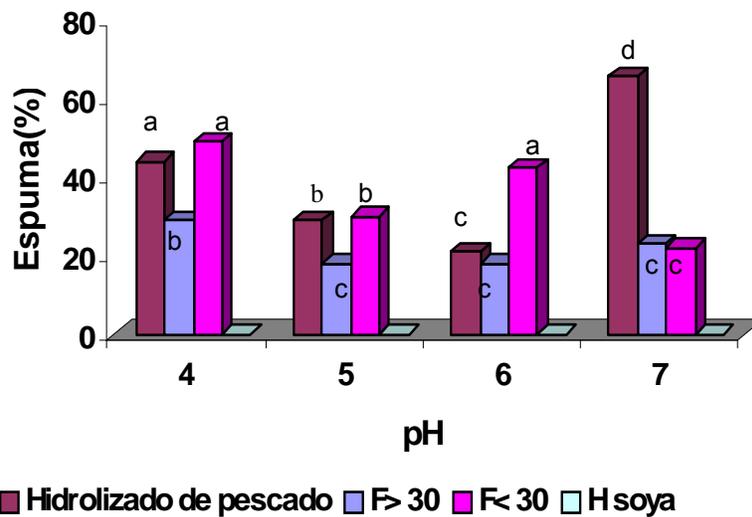


Figura 5.11 Estabilidad de espuma (% de espuma después de 30 minutos a 25°C) del hidrolizado de subproductos de carpa dorada, las fracciones mayor y menor de 30KDa y un hidrolizado comercial de soya a diferentes valores de pH. Letras diferentes implica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

La máxima estabilidad de espuma y la menor capacidad espumante presentada por el hidrolizado sin fraccionar a pH 7 y la fracción menor de 30 KDa a pH 6 concuerdan con lo reportado por Phillips (1990), quien encontró que la  $\beta$ -lactoglobulina presentó la más alta estabilidad pero no la mejor capacidad espumante a pH 5. De manera similar Ahmedna *et al* (1999) encontró que el caseinato de sodio presentó alta capacidad espumante (2 mL / mL suspensión), pero su estabilidad de espuma fue más baja que la del aislado de trigo solubilizada que presentó una capacidad espumante de 1.67 mL / mL de suspensión. Wilde y Clark (1996) reportan algo similar al indicar que una proteína puede tener una excelente capacidad espumante pero no necesariamente producir espumas estables y viceversa.

Estos resultados nos indican que el HSCD y sus fracciones pueden servir como sustitutos de proteínas en aplicaciones de alimentos que requieren alta capacidad espumante tales como pasteles, panes, cubiertas espumosas, helados, malvaviscos y postres (Mimouni *et al.*, 1999)

De estos resultados se puede decir que las propiedades emulsificantes y espumantes no sólo dependen del peso molecular sino que intervienen otros factores que tienen que ver con la composición de los péptidos, así como de las características estructurales de los mismos, ya que la fracción menor de 30 KDa y el hidrolizado comercial de soya presentan un perfil de pesos moleculares muy similar, sin embargo las diferencias en los valores obtenidos al evaluar estas propiedades funcionales pueden deberse a los factores arriba mencionados y a otros como la hidrofobicidad y la fuerza iónica (Pomeranz, 1991).

## **5.7 COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS**

La composición de aminoácidos de las diferentes fracciones peptídicas juega un papel muy importante en la producción de hidrolizados, no sólo desde el punto de vista nutricional, sino que además existen algunos aminoácidos específicos como arginina, leucina, fenilalanina y valina que contribuyen al sabor amargo (Fuke, 1994) o el efecto hidrofóbico o hidrofílico de los péptidos de acuerdo al balance del tipo de aminoácidos que están presentes. Por esta razón se llevó a cabo la determinación de aminoácidos para establecer si el hidrolizado producido cumple con la composición de aminoácidos establecida por la FAO.

La determinación de aminoácidos se realizó en un analizador de aminoácidos marca Beckman, las determinaciones se realizaron por triplicado y se empleó un estándar de aminoácidos proporcionado por Beckman. Para calcular el contenido de aminoácidos en la muestra se tomaron las áreas individuales de cada aminoácido y se transformaron en concentración usando la áreas de los picos en la solución estándar, posteriormente se determinó el contenido de cada aminoácido (expresado en mg) por cada 100 mg de proteína en la muestra (Van der Ven *et al.*, 2001)

En la Tabla 5.3 se presenta el contenido de aminoácidos de los subproductos de carpa dorada, del hidrolizado de SCD y de las fracciones mayor y menor de 30 KDa. En esta tabla se puede apreciar que el contenido de aminoácidos del HSCD es superior que el obtenido para los SCD, y en todos los casos el contenido de aminoácidos esenciales fue superior que el reportado como mínimo por la FAO (1990). De la misma manera podemos observar que tanto para el HSCD como para el HSBP el contenido de aminoácidos es muy similar al de los sustratos del cual fueron obtenidos, lo que reafirma que la hidrólisis enzimática no afecta la calidad nutricional en términos de contenidos de aminoácidos. El contenido de Alanina, leucina, metionina, tirosina, fenilalanina, histidina, prolina y cisteína reportada como ácido cisteíco en el hidrolizado de SCD fue similar a los reportados para el hidrolizado de SBP (Benjakul y Morrissey, 1997).

**Tabla 5.3 Composición de aminoácidos de los SCD, SHCD y de las fracciones mayor y menor de 30KDa.**

(mg aác./ 100 mg proteína)								
ÁÁC.	ÁÁC E <sup>1</sup>	SCD <sup>2</sup>	HSCD	F>30KDa	F<30KDa	HSOYA	SBP <sup>3</sup>	HSBP <sup>3</sup>
Ac. Asp.		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	9.72	10.1
Tre	0.9	8.11	11.40	6.56	4.84	0.00	4.86	5.12
Ser		3.40	3.48	1.90	1.58	5.31	5.35	5.33
Ac Glu		0.07	0.00	0.00	0.00	1.42	18.5	13.8
Gly		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.09	7.88
Ala		6.22	6.35	4.14	2.23	1.39	6.45	6.53
Val	1.3	2.61	2.95	1.51	1.45	0.00	4.61	4.72
Leu	1.9	6.80	8.45	4.46	4.07	2.42	7.08	7.16
Lys	1.6	5.43	5.37	5.63	4.81	2.09	8.19	8.33
Met	1.7	2.48	2.35	0.96	1.39	3.66	2.96	3.02
Ile	1.3	2.01	2.80	1.74	1.29	1.46	4.28	4.3
Tir		2.68	2.00	0.90	1.06	1.22	3.38	3.5
Fen		3.26	4.20	2.60	1.68	1.52	3.87	3.8
His	1.6	1.82	2.11	0.97	1.24	0.79	2.19	2.1
Arg		3.07	4.16	2.23	2.03	1.66	7.71	7.29
Pro		7.00	6.88	6.78	6.37	4.94	6.25	6.00
Ac. Cis		0.38	0.33	0.24	0.24	0.00	0.82	0.92

<sup>1</sup> Aminoácidos esenciales (FAO/WHO, 1990). <sup>2</sup> Subproductos de Carpa dorada.

<sup>3</sup> Subproductos de Blanco del Pacífico, Hidrolizado de SBP (Benjakul y Morrissey, 1997)

El valor de treonina fue casi 50% más alto que en otras muestras de hidrolizados como se muestra en la tabla 5.3, mientras que serina, valina, isoleucina y arginina se encontraron en porcentajes más bajos que para los otros hidrolizados. Estas diferencias pueden deberse a que se trata de diferentes especies, lo cual se hace más evidente cuando se trata de una fuente de proteína diferente como es el caso del hidrolizado de soya, que presenta un contenido de aminoácidos inferior a los obtenidos para los hidrolizados obtenidos con proteína de pescado.

El contenido de aminoácidos obtenido en el SHCD y en las fracciones mayor y menor de 30 KDa indica que estos podrían ser empleados como fortificantes de proteína. Sin embargo, para establecer su calidad nutricional serian necesarias otras evaluaciones como la digestibilidad.

## **5.8 ANÁLISIS SENSORIAL**

Los atributos responsables de la calidad sensorial de las proteínas propuestas para ser usadas como aditivos en alimentos son: color, olor y sabor. La calidad del sabor de los hidrolizados depende de varios parámetros, la calidad de la materia prima juega un papel crítico en la determinación de la calidad del sabor. Las especies grasas de pescado no son deseables por su alta susceptibilidad a la oxidación de lípidos y el alto costo para remover el exceso de grasa (Ritchie y Mackie, 1982), debido a que se obtendrían hidrolizados con problemas de aromas y sabores desagradables producto de la oxidación de los lípidos, lo que reduciría su aceptabilidad.

Los hidrolizados de proteína de pescado adquieren un sabor amargo y umami, ambas reacciones de la hidrólisis, mientras el primer sabor es indeseable, el segundo puede ser un atributo deseable (tiene una actividad potenciadora de sabor), particularmente si el producto es usado como un extensor de carne o adicionado a sopas.

Se llevó a cabo un análisis sensorial para determinar si el hidrolizado producido presentaba sabor amargo. La evaluación sensorial se realizó en el laboratorio de análisis sensorial de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, con la asesoría del M. en C. Francisco Gallardo. El panel fue seleccionado a partir del grupo de la Unidad de Enseñanza Aprendizaje de Análisis Sensorial de la misma institución. El criterio de selección de los jueces fue mediante pruebas de sensibilidad al sabor amargo en donde se empleó cafeína como estándar para evaluar el sabor amargo de acuerdo al umbral reportado por Plating (1984).

Se realizó una prueba de dúo trío y tres triangulares para seleccionar a las personas que presentaban sensibilidad al sabor amargo. Se seleccionaron 10 personas para que integraran el panel, se realizó una prueba preliminar para evaluar la presencia de sabor amargo en el hidrolizado sin fraccionar, las fracciones mayor y menor de 30KDa y el hidrolizado comercial de soya para comparación. Las muestras se prepararon en suspensiones al 3% de acuerdo con lo reportado por Imm y Lee (1999).

Se empleó una escala no paramétrica con 5 niveles:

- 1) Sabor amargo no perceptible.
- 2) Sabor ligeramente perceptible
- 3) Sabor claramente perceptible
- 4) Sabor amargo intenso
- 5) Sabor amargo muy intenso

Los resultados del estudio preliminar indicaron que tanto el hidrolizado sin fraccionar como las fracciones mayor y menor de 30 KDa se encuentran en el nivel 2, con un sabor ligeramente perceptible, no se encontró diferencia significativa entre las tres muestras. La muestra del hidrolizado de soya se colocó en el nivel 4 con un sabor amargo intenso, entre esta muestra y las tres anteriores si existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Los resultados del contenido de aminoácidos relacionados con el sabor amargo obtenido en el hidrolizado sin fraccionar y en las fracciones mayor y menor de 30 KDa concuerda con estos resultados ya que su contenido fue menor de 30 mg /100 mL de suspensión, lo cual esta por debajo de los umbrales de amargor reportados por Kato *et al* (1989) para valina, arginina, leucina y fenilalanina (40, 50, 90 y 190 mg / 100 mL respectivamente).

La evaluación del sabor amargo en el SHCD y sus fracciones nos ha permitido considerar que no presentan uno de los principales defectos de aceptabilidad que es el sabor amargo sin embargo, para su incorporación en formulaciones alimenticias sería necesario evaluar otros atributos sensoriales importantes como color, olor y otros sabores que podrían estar presentes.

Con base en los resultados obtenidos en la caracterización funcional, el contenido de aminoácidos y la evaluación del sabor amargo se proponen las posibles aplicaciones que podría tener el SHCD y las fracciones mayor y menor de 30 KDa. En la tabla 5.4 se presenta un resumen de las propiedades evaluadas así como también las posibles aplicaciones que podrían tener cada una de las muestras obtenidas. Para establecer si los resultados de cada propiedad son adecuados para la utilización de los productos obtenidos en formulaciones alimenticias se indican los valores reportados; para el caso de solubilidad, capacidad espumante y contenido de aminoácidos se indican los valores mínimos. En el caso del índice de actividad emulsificante (IAE) se presenta el rango de valores reportados considerados como adecuados para emulsificación.

Todos los productos obtenidos podrían ser empleados en la elaboración de bebidas de jugos y frutas fortificadas, ya que todos poseen buena solubilidad además de que solo presentan un sabor ligeramente amargo.

El hidrolizado de SCD y la fracción mayor de 30 KDa podrían tener aplicaciones potenciales en productos donde se requiere de una buena capacidad emulsificante y espumante como embutidos, sopas, mayonesas. Por otro lado la fracción menor de 30 KDa podrían ser empleado por su contenido de aminoácidos y su tamaño molecular como fortificante en formulas para niños y ancianos, como fuente de nitrógeno en medios de cultivo y en alimentación para peces.

**Tabla 5.4 Análisis de las propiedades evaluadas en el SHCD y sus fracciones para proponer posibles usos.**

PROPIEDAD	VALOR REFERENCIA	VALOR OBTENIDO		
		HSCD	F > 30 KDa	F < 30 KDa
Solubilidad mínima (%)	80 <sup>1</sup>	70-96	86-98	82-99
IAE (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	10-30 <sup>2</sup>	15 (pH 4)*	22 (pH 5)*	7
Estabilidad de emulsión (%)		82 (pH 4,5)*	98	60 (pH 5)*
Capacidad espumante mínima (mL espuma /100mL susp.)	135-140 <sup>3</sup>	170 (pH 4,5)*	150	130 (pH 4)*
Estabilidad de espuma (%)		60 (pH 7)*	30 (pH 4)*	50 (pH 6)*
Amargor (percepción)	Intensa <sup>4</sup>	Ligera	Ligera	Ligera
Contenido de aác.	AAE <sup>5</sup>	Superior	Superior	Superior
<b>POSIBLES USOS</b> <sup>6,7,8,9,10,11,12</sup>	Jugos de frutas y vegetales, fortificante de cereales, fuente de nitrógeno en medios de cultivo, suplemento nutricional, antioxidante.			
	Productos de panificación y de repostería, mayonesas, productos cárnicos, sopas, cubiertas espumosas y helados.		Formulas para infantes y ancianos, alimentación para peces	

<sup>1</sup> Quaglia y Orban, 1987. <sup>2</sup> Liceaga y Li-Chan, 1999. <sup>3</sup> Jara, 1997; Ahmedna *et al.*, 1999. <sup>4</sup> Sabor amargo claramente perceptible, empleando cafeína como estándar. <sup>5</sup> Aminoácidos esenciales de acuerdo con la FAO/WHO, 1982. <sup>6</sup> Oliva\_Teles *et al.*, 1999. <sup>7</sup> Franek *et al.*, 2000. <sup>8</sup> Cordle *et al.*, 1991. <sup>9</sup> Deeslie y Cheryan, 1988. <sup>10</sup> Kristinson y Rasco, 2000b. <sup>2,11</sup> Hettiarachchy y Kalapathy, 1997. <sup>12</sup> Peña-Ramos y Xiong, 1999. \*En estos datos se presenta el valor de pH al cual se obtuvo el máximo valor.

En este trabajo se realizó una evaluación de las propiedades más importante que determina el uso potencial de los hidrolizados en la industria de alimentos, tratando de no solo enfocarnos al aspecto funcional sino también al aspecto nutricional y sensorial.

### 6. CONCLUSIONES

Las condiciones de hidrólisis empleadas para la obtención del hidrolizado de subproductos de carpa dorada generaron péptidos con pesos moleculares en un rango de peso molecular de 1KDa A 44 KDa, lo cual nos permitió realizar la separación por ultrafiltración en fracciones de péptidos mayores y menores de 30 KDa. Se obtuvo una eficiencia del 70% en la separación de la fracción mayor de 30 KDa a las condiciones de ultrafiltración empleadas.

Las fracciones mayor y menor de 30 KDa presentaron valores de solubilidad superiores al 80% a todos los valores de pH probados (4, 5, 6 y 7) al igual que el hidrolizado sin fraccionar a pH de 4, 6 y 7. Estos resultados son favorables ya que como se ha mencionado en diversos reportes, la solubilidad es una de las propiedades que se busca mejorar mediante la modificación enzimática; especialmente en el caso de las proteínas de pescado, las cuales son prácticamente insolubles. Además de que la solubilidad afecta a otras propiedades en las que se requiere de la solubilización previa de la proteína.

La capacidad emulsificante de la fracción mayor de 30 KDa fue más alta que la del hidrolizado sin fraccionar hasta en un 197% a pH 7, lo cual involucro una reducción de la capacidad emulsificante en la parte restante del hidrolizado (fracción menor de 30 KDa), la cual aún siendo inferior al hidrolizado sin fraccionar y a la fracción mayor de 30 KDa presentó valores superiores al hidrolizado comercial de soya.

El hidrolizado sin fraccionar y la fracción mayor de 30 KDa presentaron valores de capacidad espumante comparables con los reportados para ovoalbúmina a pH 4 y 5. La ovoalbúmina es empleada como proteína estándar de funcionalidad, lo cual nos indica que estos peptidos son buenos candidatos para ser empleados en formulaciones de alimentos en donde la propiedad de formación de espuma es requerida. Mientras que la fracción menor de 30 KDa presentó valores de capacidad espumante de tan solo el 30% de los valores obtenidos para la fracción mayor de 30 KDa, pero con buenos resultados en la estabilidad de la espuma formada.

El hidrolizado de subproductos de carpa dorada y sus fracciones mayor y menor de 30 KDa presentan en general propiedades funcionales superiores a las del hidrolizado comercial de soya.

El contenido de aminoácidos del hidrolizado de SCD es comparable con los SCD y con otros hidrolizados de proteína de pescado y el contenido de aminoácidos esenciales obtenido para el HSCD es superior al reportado por la FAO (1989), por lo que este hidrolizado podría emplearse como fortificador de alimentos.

Los resultados de la evaluación sensorial nos indican que el hidrolizado sin fraccionar y las fracciones mayor y menor de 30 KDa presentaron un sabor amargo ligeramente perceptible, mientras que el sabor amargo del hidrolizado de soya fue claramente perceptible ( $p < 0.05$ ).

La utilización de subproductos de carpa dorada para la producción de hidrolizados, mediante la acción de Flavourzyme, nos permitió obtener fracciones peptídicas dentro de dos rangos de peso molecular (mayores y menores de 30 KDa) con buenas características funcionales, sensoriales y nutricionales que podrían tener una amplia gama de aplicaciones, no solo en la industria alimentaria.



## 7. RECOMENDACIONES

Al analizar los alcances de este trabajo de tesis nos damos cuenta de que existen algunas actividades que sería conveniente llevar a cabo en un futuro en pro de ampliar los alcances del mismo.

Una de las primeras actividades que se recomiendan es la valoración microbiológica de los hidrolizados debido a que la materia prima que se emplea es muy susceptible a la contaminación microbiana, por la gran manipulación a la que es sometida, aún cuando se tomaron algunas precauciones durante la producción de los hidrolizados (tratando de mantener el producto en baño de hielo para evitar un aumento de temperatura, lo cual que favorecería la contaminación) sería conveniente garantizar la sanidad de los hidrolizados.

La determinación del contenido de aminoácidos nos proporcionó información referente a la calidad nutricional de los péptidos obtenidos, pero determinar la secuencia que guardan estos dentro de la cadena polipeptídica permitiría conocer más ampliamente el comportamiento funcional de los mismos; sobre todo identificando los aminoácidos que se encuentran en los extremos del péptido.

La alergenicidad es otro factor importante a evaluar en los hidrolizados, principalmente los que están presentes en la fracción menor de 30 KDa; sobre todo si estos pueden ser destinados al consumo humano.

## BIBLIOGRAFÍA

Adler-Nissen, J. y Olsen, H. 1979. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. In *Food Chem.* Pour –El. A., Ed., American Chemical Society, Washington, D. C.

Adler-Nissen, J. 1986. *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier Applied Science Publisher Ltd., London and New York. p.146.

Ahmedna, M., Prinyawiwatkul, W y Rao, R.M.1999. Solubilized wheat protein isolate: functional properties and potencial food applications. *J. Agric Food Chem.* 47, 1340-1345.

Arai, S.; Yamashita, H.; Kato, M. y Fujimaki, M. 1970. Applying proteolytic enzymes on soybeans 5. A nondialyzable bitter peptide in peptic hydrolysate of soybeans protein and its bitterness in relation to the chemical structure. *J. Agric. Biol. Chem.* 34, 729-738.

Baek, H.H. y Cadwallader, K.R. 1995. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. *J. Food Sci.* 60 (5), 929-935.

Bárzana, E. y García-Garibay, M. 1994. Production of fish protein concentrates. In: *Fisheries Proc. Biotech. Applications*. Martin, A.M., Ed. Chapman & Hall, London. 206-243.

Benjakul, S. y Morrissey, M.T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific Whiting solid wastes. *J. Agric Food Chem.* 45, 3423-3430.

Bhumiratana, S. Hill Jr, C.G.1977. Enzymatic solubilization of Fish Protein Concentrate in Membrane Reactors. *J. Food Sci.* 42 (4). 1016-1021.

Charum E. y Galvés A. 1993. Efecto de una hidrólisis enzimática limitada y de una desamidación química sobre la solubilidad y las propiedades emulsificantes del gluten de trigo. Implementación de un proceso piloto. Informe final de proyecto. Relaciones Exteriores. México. D.F. Marzo

Cherry, J.P. y Mc. Waters, K.H. 1981. Whippalability and aeration. In *Protein Functionality and Process Applications*; Cherry, J.P., Ed.; American Society: Washington, DC., 149-176

Cheryan, M. y Mehaia, M. A. 1990. Membrane bioreactors: Enzyme processes. In *Biotechnology and Food Process Engineering*, H. Schwartz-berg and M. A. Rao Ed. Marcel Dekker, New York. 67.

Clemente, A., Vioque J., Sanchez, R. Pedroche, J. y Millan, F. 1999. Production of extensive chickpea (*Cicer aritinum L.*) protein hydrolysates with reduced antigenic activity. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3776-3781.

Cordle, C. T., Mahmoud, M.I. y Moore, V. 1991. Immunogenicity evaluation of protein hydrolysates for hypoallergenic infant formulae. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 13, 270 – 276.

Cui, H. 1996. The Influence of Degree of Hydrolysis on the Structural and Functional Properties of Fish Protein Peptic Hydrolysates. Masters Thesis. University of Washington, Seattle, W.A.

Dagorn-Scaviner C., Gueguen, y Lefebvre J. 1987. Emulsifying properties of pea Globulins as related to their adsorption behaviors. *J. Food Sci.* 52 2 . 335-341.

Damodaran, S. 1996. Aminoacids, peptides, and proteins. In *Food Chemistry*, 3er ed., Fennema. O. R., Ed., Marcel Dekker Inc., New York.

Deeslie, W.D. y Cheryan M. 1988. Functional properties of soy protein hydrolysates from a continuous ultrafiltration reactor. *J. Agric.Food Chem.* 36, 26-31.

Deeslie, W.D. y Cheryan M. 1991. Fractionation of soy protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *J. Food Sci.* 57 (2), 411-413.

FAO/ WHO. 1990. Protein Quality Evaluation Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation held in Bethesda. Md., 4 –8 December 1989, Roma.

Fennema, O. R. 1996. Food Chemistry, 3<sup>a</sup> ed.; Dekker: New York, 365-424.

Finch, R. 1977. Whatever happened to fish protein concentrate?. Food Technol., 31 (5) 44-53.

Franek, F., Hohewarter, O. y Katinger, H. 2000. Plant protein hydrolysates: Preparation of defined peptide fractions promoting growth and production in animal cells cultures. Biotechnol, Prog. 16, 688-692.

Fujimaki, M., Yamashita, M., Okazawa, Y., y Arai, S. 1968. Difusible bitter peptides in peptic hydrolyzate of soybean protein. Agric. Biol. Chem., 32 794.795.

Fuke, S. 1994. Taste active components of seafoods with special reference to umami substances. In *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality*; Shahidi, F., Botta, J. R., Eds.; Blackie Academic & Professional: London, U.K., Ch. 8.

Gauthier, S. F.; Paquin, P.; Pouliot, y Turgeon, S. 1993. Surface activity and related functional properties of peptides obtained from whey proteins. J. Dairy Sci. 76, 321-328.

Hettiarachchy N.S.; Griffin, V. K. y Gnanasambandam, R. 1996. Preparation and functional properties of a protein isolate from defatted wheat germ. Cereal Chem. 73 (3), 364-367.

Hettiarachchy N.S. y Kalapathy, U. 1997. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. J. Food Sci. 62 (6), 1110- 1115.

Hirs, C. H. W., Stein, W. H., y Moore, S. 1954. Biol. Chem. 211, 941

Hoyle, N.T. y Merrit, J.H. 1994. Quality of Fish protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). J. Food Sci. 59 (1), 76-79.

Imm, J.Y. y Lee C.M. 1999. Production of seafood flavor from Red Hake (*Urophycis Chuss*) by enzymatic hydrolysis. J. Agric. Food Chem. 47, 2360-2366.

Jara, M. M. 1997. Obtención de hidrolizados Funcionales y Nutritivos de soya por medio de la hidrólisis y síntesis enzimática y ultrafiltración. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

Jost, R. y Monti, J. C. 1977. Partial enzymatic hydrolysis of whey protein by tripsin. J. Dairy Sci. 60, 1387.

Kato H.; Rhue, M.R.; Nishimura, T. 1989. Role of free aminoacids and peptides in food taste. In Flavor chemistry: Trends and Developments; Teranishi, R., Ed. American Chemical Society, Washinton, D.C. pp 158-174.

Kester, J. J. y Richardson, T. 1984. Modification of whey protein by tripsin, J. Dairy Sci. 67, 2757.

Kinsella, J. E. 1976. Functional properties of proteins in foods: a survey. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 8 (4), 219.

Kinsella, J. E. 1979. Functional properties of soy proteins. J. Am. Oil Chem. Soc. 56, 242.

Kinsella, J. E. y Srinivasan, D. 1981. Nutritional, chemical and physical criteria affecting the use and acceptability of proteins in foods. In *Criteria of Food Acceptance*. Foster Verlag, Swizarland.

Kristinsson, H. G. y Rasco B.A. 2000a. Fish protein Hydrolysates: Production, Biochemical and Functional Properties. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 40 (1), 43-81.

Kristinsson, H. G. y Rasco B.A. 2000b. Biochemical and functional properties of Atlantic Salmon ( *Salmo salar* ) muscle proteins hydrolysate with various alkaline proteases. J. Agric. Food Chem. 48, 657-666.

Kuehler, C. A. y Stine, C.M. 1974. Efect of enzymatic hydrolysis on some functional properties of whey protein. J. Food Sci. 39, 379.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head or

bacteriophage T4. Nature 227. 680.

Lalaidis, G. y Sjoberg, L.B. 1978. Two new methods of debittering protein hydrolysates and a fraction of hydrolysates with exceptionally high content of essential aminoacids. J. Agric. Food Chem., 26(3), 742-9

Lee, S. W. ; Shimizu, M.; Kaminogama, S. y Yamauchi, K. 1987. Emulsifying properties of a mixture of peptides derived from the enzymatic hydrolysates of bovine caseins. J. Agric. Biol. Chem. 52, 1535.

Liaset, B., Lied, E., y Espe, M. 2000. Enzymatic hydrolysis of by.products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. J. Sci Food Agric. 80, 581- 589.

Liceaga-Gesualdo, A. M. y Li-Chan E.C.Y. 1999. Functional properties of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). J. Food Sci., 64 (6), 1000 –1004.

Li-Chan, E. y Nakai, S.; Wood, D. F. 1984. Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties. J. Food Sci. (49), 345-350.

Linder, M.; Fanni, J. y Parmentier, M. 1996. Functional properties of veal bone hydrolysates. J. Food Sci. 61. 712 – 720.

Mackie, I. M. 1983. New approaches in the use of fish proteins, *in Developments in Food Proteins-2* (ed.B.J.L.. Applied Science,London, 215-262.

Maeshashi, K., Matsuzaki, M. Yamamoto,Y. y Udaka S. 1999. Isolation of peptides from an enzymatic hydrolysate of food proteins and characterization of their taste properties. Biotechnol. Biochem. 63 (3) , 555-559.

Mahmoud, M.I.; Malone, W. T. y Cordle, C.T. 1992. Enzymatic hydrolysis of casein: efect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. J. Food Sci. 57 (5), 1223.

Mahmoud, M.I. 1994. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in

nutritional products. Food Technol. October, 89-95.

Mangino, M.E. 1994. Proteins interactions in emulsions: protein – lipid interactions. Chap. 10 in *Protein Functionality in Foods Systemes*, N. S. Hettiarachchy and G.R. Ziegler Ed., Marcel Dekker, Inc., New York. 311 – 324.

Matil, K.F. 1971. The functional requeriments of protein for foods. J. Am. Oil Chem. Soc. 48, 477 –480.

Maubois, J.L.; Pierre, A. 1987. Bulletin IDF. 212, 154.

Mimouni, B.; Aranza, J. L. y Raymond, J. 1999. Influence of double enzymic hydrolyses on gluten functionality. J. Sci. Food Agric. 79, 1048- 1053.

Moore, S. y Stein, W. H. 1963. Methods in Enzymology. Colowick, S. P. and Kaplan, N.O. Eds. Academic Press, New York City. Vol. 6, 819

Morr, C. V.; German, B.; Kinsella, J. E.; Regenstein, J. M.; Van Buren, J. P.; Kilara, A.; Lewis, B. A. y Mangino, M. E. 1985. A collaborative study to develop a standarized food protein solubility procedure. J. Food Sci. 50, 1715-1718.

Mullally, M. M.; O’Callaghan, D. M.; Fitz Gerald, R. J.; Donnelly, W. J. y Dalton, J.P. 1994. Proteolytic and peptidolytic activities in comercial pancreatin protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolysate characteristics. J Agric. Food Chem. 42, 2973.

Mullally, M. M.; O’Callaghan, D. M.; Fitz Gerald, R. J.; Donnelly, W. J. y Dalton, J.P. 1995. Zymogen activation in pancreatic endoproteolytic preparations and influence on some whey protein characteristics. J. Food Sci., 60 (2), 227.

Nakai, S, Ho, L., Helbig, N., Kato, A. y Tung, M. A. 1980. Relationship between hydrophobicity and emulsifying properties of some plant protein. J. Food Sci. Technol. 13, 23- 27.

Nakai, S., y Powrie, W. D. 1981. Modification of proteins for functional end nutritional

improvementes. In *Cereals- A Renewable Resource, Theory and Practice*. Chap. 11 Eds. Pomeranz, Y. y Munck, L. 217 –242. American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota.

Novo Nordisk Technical Bulletin. 1977. Alcalasa™ Food Grade. Enzyme Process Division.

Novo, Nordisk, 2000. Flavourzyme™ Product Sheet.

Oliva-Teles, A., Cerqueira, A. L. y Goncalves, P. 1999. The utilization of diets containing high levels of fish protein hydrolysate by turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture*. 179, 195-201.

Onodenaloro, A. C. y Shahidi, F. 1996. Protein dispersions and hydrolysates from shark (*Isurus oxyrinchus*). *J. Aqua. Food Prod. Technol.* 5 (4), 43 – 59.

Panyam, D y Kilara, A. 1996. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends Food Sci. Technol.*, April. 120-125.

Parker, N. S. 1987. Properties and functions of stabilizing agents in food emulsion. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 25 (4), 285.

Parrado, J., Bautista, J. y Machado, A. 1991. Production of soluble enzymatic protein hydrolysate from industrially defatted dehulled sunflower meal. *J. Agric. Food Chem.* 39, 447-

Pearce, K. N. y Kinsella, J.E 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.* 26 3. 716-723.

Peña-Ramos, E. A. y Xiong Y. L. 1999. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates produced by different enzymes. *The IFT Annual Meeting*. 50A-41.

Peterson, G. L. 1977. A Simplification of the Protein assay Method of Lowry et al. Which is more Generally Applicable. *Anal. Biochem.* 83. 346-350.

Phillips, M. C. 1981. Protein conformation at liquid interfaces and its role in stabilizing emulsions and foams. *Food Technol.*, 35, 50.

Phillips, L. G.; Davis, M. J. y Kinsella, J. E. 1989. *Food Hydrocolloids*. 3, 163.

Phillips, L. G.; German, J.B. ; O'Neill, T. E.; Foegeding, E. A.; Harwalkar, V. R.; Kilara, A.; Lewis, B. A.; Mangino, M. E.; Morr, C. V.; Regenstein, J. M.; Smith, D. M. y Kinsella, J. E. 1990. Standardized procedure for measuring foaming properties of three proteins, a collaborative study. *J. Food Sci.* 55, (5) 1441.

Phillips, L. G. 1992. Ph. D. Thesis. Cornell University, Ithaca, New York.

Phillips, L. G., Whitehead, D. M. y Kinsella, J. 1994. Structure function properties of food proteins. Academic Press, San Diego, Calif., U.S.A.

Platting, K. H. 1984. The sense of taste. In: *Sensory analysis of foods*. Ed. Piggott, J.R. Elsevier Applied Science Publishres. London. 10.

Pomeranz, Y. 1991. Proteins General. In *Functional Properties of Food Components* Academic Press, Inc. San Diego California. 147.

Quaglia, G. B. y Orban, E. 1987. Enzymic solubilisation of proteins of sardine (*Sardina Pilchardus*) by commercial proteases. *J. Sci. Food Agric.*, 38, 263-269.

Quaglia, G. B. y Orban, E. 1990. Influence of the enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysates. *J. Food Sci.* 55 (6), 1571-1573.

Rayner, C. J. 1985. Protein hydrolysis of animal feeds for amino content. *J. Agric. Food Chem.* 33 (4), 722-725.

Rebeca, B.D.; Peña-Vera, M. T y Díaz-Castañeda, M. 1991. Production of Fish Protein Hydrolyzates with Bacterial Proteases; Yield and Nutritional Value. *J. Food Sci.* 56 2 309-314.

Rivera, M.G., 1990. Desarrollo de un proceso enzimático para la obtención de hidrolizados de pescado de desecho. Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado. CCH.UNAM. México.

Richie, A. H. y Mackie, I.M. 1982. Preparation of fish protein hydrolysates. *Anim Feed Sci. Technol.* 7, 125 – 133.

Ricks, E.; Ridling, B.; Lacobucci, G. A. y Myers, D. V. 1978. Approaches to analyze and optimize protein hydrolyzates. In *Biochemical aspects of new food proteins*; Adler-Nissen, J., Ed.; Pergamon: New York.

Shahidi, F.; Synowiecki, J. y Balejko, J. 1994. Proteolytic hydrolysis of muscle proteins of harp seal (*Phoca groenlandica*). *J. Agric. Food Chem.* 42, 2634 – 2638.

Shahidi, F.; Han, X. y Synowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem.* 53, 285 – 293.

Shimidzu, M.; Lee, S. W.; Kaminogama, S. y Yamauchi, K. 1986. Functional properties of a peptide of 23 residues purified from the peptic hydrolyzate of  $\alpha_{s1}$  casein: Changes in the emulsifying activity during purification of the peptide. *J. Food Sci.* 51, 1248.

Sikorski, Z.E. y Nack, M. 1981. Modification of technological properties of fish protein concentrate. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 14(3), 201-230.

Skanderby, M. 1994. Protein hydrolysates: their functionality and applications. *Food Technol. Int. Eur.*, 10, 141.

Sumaya, T. 2000. Producción enzimática de hidrolizados proteicos a partir de subproductos de la industria pesquera. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. México.

Tejeda, A., Montesinos, R. M., y Guzmán, R. 1995. Bioseparaciones. UNISON. Hermosillo, Son., México. 547-589.

Townsend, A. y Nakai, S. 1983. Relationship between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins. *J. Food Sci.* 48, 588-594.

Turgeon, S. L., Gauthier, S. F., y Paquin., P. 1991. Interfacial and emulsifying properties of whey peptide fractions obtained with a two step ultrafiltration process. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 637.

Turgeon, S.L. Gauthier, S.F. y Paquin P. 1992. Emulsifying property of whey peptide fractions as a function of pH and ionic strength. *J. Food Sci.* 57 (3), 601-609, 634.

Van der Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D.B.A., y Voragen, A. G. J. 2001. Emulsion properties of casein and whey protein hydrolysates and the relation with other hydrolysates characteristics. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5005-5012.

Viera, G. H. F.; Martin, A. M.; Saker-Sampaio, S.; Omar, S. y Goncalves, R. C. F. 1995. Studies on the enzymatic hydrolysis of Brazilian lobster (*Panulirus spp*) processing wastes. *J. Sci. Food Agric.* 69, 61.

Walstra, P. 1983. Formation of emulsions Chap. 2. In *Encyclopedia of Emulsion Technology*. Vol. 1. P. Becher (Ed) Marcel Dekker Inc., New York.

Walton, S.I., Lenart, B.B. y Lenar, K.B.O. 1972. Inventors: Fish protein isolate. U.S. Patent 1,3,48,241. 4p int c12: A 23 J1/04.

Whitaker, J. R. 1972. Principles of enzymology for the Food Sciences. Marcel Dekker, Inc. New York.

Wilde, P. J., y Clark, D.C. 1996. Foam formation and stability. In *Methods for testing protein functionality*. Hall, G. M. (Ed), Blackie Academic and Professional, London, Engl. 110-148.

Yu, S. Y. y Fazidah, S. 1994. Enzymic hydrolysis of proteins from *Arisnchthys noblis* by proteasa P "Amano" 3, *Trop. Sci.* 34, 381.



## ANEXO A

### CURVA PATRÓN DE PROTEÍNA

Para determinar el contenido de proteína se construyó una curva patrón de proteína empleando como referencia Bovino sero albúmina (BSA).

- ◆ Se preparó una solución de proteína a una concentración de 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de BSA .
- ◆ Se realizaron diluciones de acuerdo a la siguiente tabla para obtener 10 puntos para la curva.
- ◆ El volúmen total en cada tubo debe ser de 1 mL

No. Tubo	Solución Patrón De BSA ( $\mu\text{L}$ )	Agua Desionizada ( $\mu\text{L}$ )	Concentración de proteína ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )
Blanco	0	1000	0
1	100	900	10
2	200	800	20
3	300	700	30
4	400	600	40
5	500	500	50
6	600	400	60
7	700	300	70
8	800	200	80
9	900	100	90
10	1000	0	100

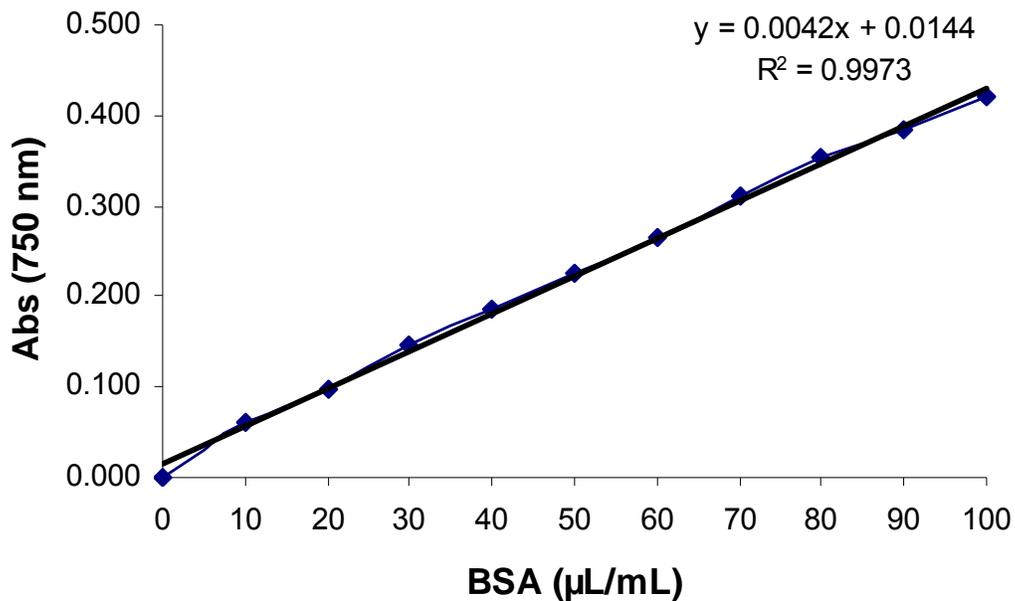
## SOLUCIONES:

Carbonato de sodio	10%
Tartrato de sodio	0.1%
Potasio y sulfato de cobre (CTC)	0.2%
Hidroxido de sodio (NaOH)	0.8N
Sulfato dodecil de sodio (SDS)	10%

Solución A: mezclar volúmenes iguales de CTC, NaOH y SDS.

Solución B: reactivo de Folin- Ciocalteu – Fenol, 1:6 ( 1 volumen de reactivo + 5 volúmenes de agua desionizada).

1. Adicionar 1mL de solución A en cada tubo con agitación continua
2. Reposar 10 minutos a temperatura ambiente
3. Adicionar 0.5 mL de solución B, con agitación continua
4. Reposar 30 minutos a temperatura ambiente
5. Leer absorbancia a 750 nm ( la reacción del color es estable en un intervalo de 30 a 120 minutos).



## ANEXO B

### CURVA PATRON DE L- LEUCINA

Se preparó una solución patrón de L- leucina a una concentración de 6 mM y se realizaron diluciones de acuerdo a la siguiente tabla.

No. Tubo	Solución Patrón L-leucina ( $\mu$ L)	Agua Desionizada ( $\mu$ L)	Concentración L-Leucina (mM)
Blanco	0	100	0
1	10	90	0.6
2	20	80	1.2
3	30	70	1.8
4	40	60	2.4
5	50	50	3.0
6	60	40	3.6
7	70	30	4.2
8	80	20	4.8
9	90	10	5.4
10	100	0	6.0

1. Se tomaron 64  $\mu$ L de cada dilución y se colocaron en frascos ámbar de 4mL
2. Se adicionó 1mL de buffer de fosfatos 0.2 M a pH 8.2.
3. Se adicionaron 0.5 mL de TNBS al 0.05%, con agitación.
4. Se colocaron en un baño maria a 50°C, durante 30 minutos.
5. La reacción se detuvo adicionando 1mL de sulfito de sodio 0.1M.
6. Se mantuvieron las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos.
7. Se leyó absorbancia a 420 nm.

El grado de hidrólisis se determinó con la siguiente formula:

$$GH = [(\alpha \text{ aminos}_t - \alpha \text{ aminos}_{t_0} / \alpha \text{ aminos}_{\text{max}} - \alpha \text{ aminos}_{t_0})] \times 100$$

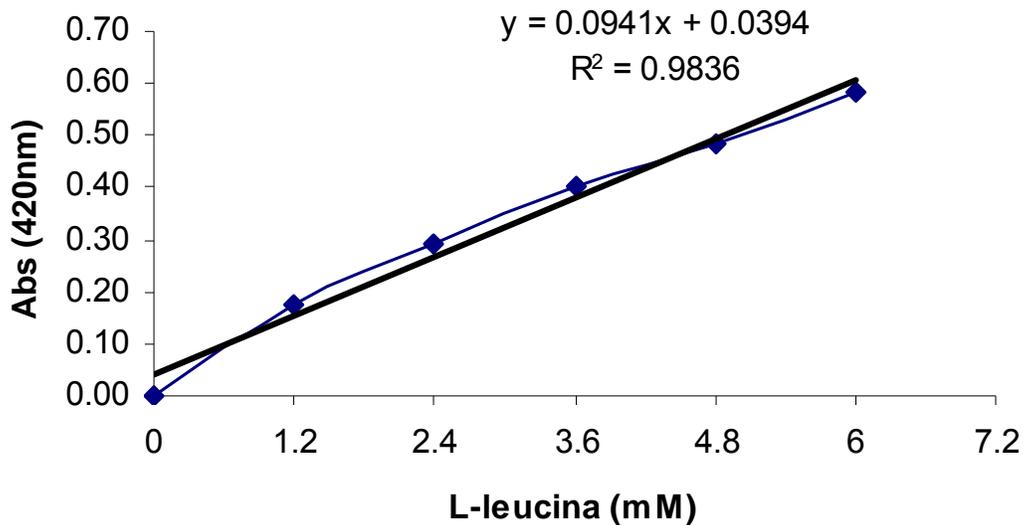
Donde:

$\alpha \text{ aminos}_t$  =  $\alpha$  aminos liberados en un tiempo dado.

$\alpha \text{ aminos}_{t_0}$  =  $\alpha$  aminos liberados al tiempo 0

$\alpha \text{ aminos}_{\text{max}}$  =  $\alpha$  aminos liberados por hidrólisis ácida total

La hidrólisis ácida total se realizó colocando 0.5 mL de la suspensión proteica en una ampolleta de vidrio y se agregaron 4.5 mL de HCl 6N, se selló al vacío y se mantuvo a 100°C durante 24 horas, después del este tiempo se detuvo la hidrólisis adicionando 4.5 mL de NaOH 6N. Se filtró la muestra para eliminar las posibles cenizas y se determinaron los  $\alpha$  aminos de la forma descrita anteriormente.



---

---

## ANEXO C

### REACTIVOS PARA ELECTROFORESIS

- ◆ A – Acrilamida / bis (30% T, 2.67% C)

Acrilamida 29.2 g

N'N'- bis – metil – acrilamida 8.0 g

Disolver en agua desionizada y aforar a 100 mL, almacenar a 4°C

- ◆ B – Buffer 1.5 M tris HCl, pH 8.8

18.15g Tris base / 100 mL

Ajustar a pH 8.8 con HCl 6N.

- ◆ C – Buffer 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8

6 g Tris base / 100 mL

Ajustar a pH 6.8 con HCl 6N.

- ◆ F – Buffer de corrida pH 8.3

Tris base 9.0 g

Glicina 43.2 g

SDS 3.0 g

Disolver en 600 mL de agua desionizada.

Tomar 80 mL y ponerlos en 320 mL H<sub>2</sub>O

- ◆ G – SDS (10%)

Disolver 10 g SDS en agua desionizada y agitación moderada y aforar a 100 mL con agua desionizada.

## ◆ Buffer muestra

Agua desionizada	4.0 mL
Tris – HCl pH 6.8, 0.5 M	1.0 mL
Glicerol	0.8 mL
SDS 10% (w/v)	1.6 mL
2 b- mercaptoetanol	0.4 mL
Azul de bromofenol 0.05% (w/v)	0.2 mL

## ◆ Solución teñidora

Azul de Comassie G – 250	0.1%
Metanol	40.0%
Acido acético	10.0%
Agua desionizada	50.0%

## ◆ Solución desteñidora

Metanol	40.0%
Acido acético	10.0%
Agua desionizada	50.0%

## ◆ Gel de Separación (12%)

Agua desionizada	5.025 mL
Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8	3.750 mL
SDS 10%	150 µL
Acilamida / bis	6.0 mL

---

Desgasificar 15 minutos a temperatura ambiente y adicionar los siguientes reactivos:

Persulfato de amonio	80.0	μL
TEMED	8.0	μL

◆ Gel de Concentración (4%)

Agua desionizada	6.1	mL
Tris – HCl 0.5 M, pH 6.8	2.5	mL
SDS 10%	100	μL
Acilamida / bis	1.3	mL

Desgasificar 15 minutos a temperatura ambiente y adicionar los siguientes reactivos:

Persulfato de amonio	60.0	μL
TEMED	16.0	μL

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó

**Martha Patricia Estrada Corona**

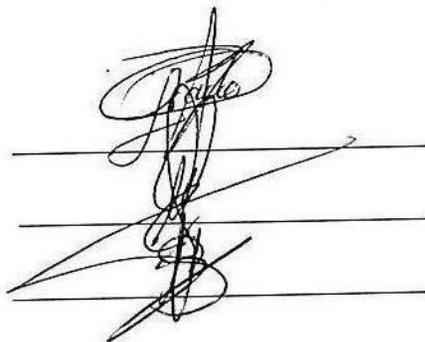
El día 19 de Junio del año 2002

**Comité Tutorial**

Directora: Dra. Lilia Arely Prado Barragán

Asesor: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesor: Dr. Sergio Huerta Ochoa



**Comité de Evaluación**

Presidenta: Dra. Ruth Pedroza Islas

Secretario: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Vocal: Dr. Carlos Regalado González

Vocal: Dr. Ernesto Favela Torres

