

**OBTENCIÓN DE HIDROLIZADO DE PROTEINA DE PESCADO A PARTIR DE
TILAPIA ROJA (*Oreochromis sp.*)**

**OBTAINING OF HYDROLYZED FISH PROTEIN FROM RED TILAPIA
(*Oreochromis sp.*)**

DIANA CRISTINA SUAREZ RAMIREZ

Trabajo final para optar al título de ESPECIALISTA EN CIENCIA Y TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

**DIRIGIDO POR:
NESTOR ARIEL ALGECIRA ENCISO**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESPECIALIZACION EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
BOGOTA D.C.
2010**

Contenido

RESUMEN.....	3
INTRODUCCION.....	5
CAPITULO 1. FUNDAMENTACION	7
1.1 SITUACION DE LA PESCA EN COLOMBIA	7
1.2 EL PESCADO: TILAPIA	8
1.3 PROPIEDADES Y APLICACIONES DE LOS HIDROLIZADOS DE PROTEINA DE PESCADO	10
1.4 PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCION.....	12
1.5 FACTORES DEL PROCESO	13
CAPITULO 2. MATERIALES Y METODOS	16
2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	16
2.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	16
CAPITULO 3. RESULTADOS.....	25
3.1 EL HIDROLIZADO	25
3.2 PROPIEDAD EMULSIFICANTE.....	25
3.3 SOLUBILIDAD	27
3.4 ANÁLISIS ESTADISTICO	29
3.5 ACTIVIDAD ENZIMATICA.....	35
CAPITULO 4. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
4.1 DISEÑO CONCEPTUAL PROCEDIMIENTO	44
CAPITULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	47
BIBLIOGRAFIA.....	48

RESUMEN

Mediante la hidrólisis enzimática de proteínas hasta péptidos o aminoácidos, por la acción de enzimas proteolíticas se obtienen hidrolizados con una composición final que los hace aplicables en la tecnología alimentaria por sus propiedades nutricionales o funcionales.

Además del proceso de hidrólisis, existen una serie de factores que necesitan considerarse, como la naturaleza y calidad de la materia prima, la enzima escogida y las condiciones de reacción. Usando como sustrato de proteína filetes de tilapia roja y evaluando sobre éstos diferentes concentraciones de enzimas, se obtuvieron hidrolizados con diferentes valores de actividad emulsionante y de solubilidad. Fue posible además proponer un diseño conceptual para la obtención de hidrolizados comprendiendo las variables y condiciones de reacción.

Palabras Claves: Tilapia roja, Hidrolizado, Propiedades funcionales, Proteína

ABSTRACT

Through the enzymatic hydrolysis of proteins to peptides and amino acids by the action of proteolytic enzymes are obtained hydrolysates with a final composition that makes them applicable in food technology for its nutritional or functional properties.

In addition to the hydrolysis process, a number of factors need to be considered, including the nature and quality of raw material, the enzyme chosen and the reaction conditions. Using as a substrate of protein red tilapia fillets and evaluating on them different concentrations of enzymes, it was possible to obtain hydrolysates with different values of emulsifying activity and solubility. It was also possible to propose a conceptual design for obtaining hydrolysates understanding the variables and reaction conditions.

Keywords: Red tilapia, Hydrolysate, Functional properties, Protein.

INTRODUCCION

En algunos sectores del país con alta producción de peces no se cuenta o es difícil el manejo de tecnologías de conservación por congelamiento del pescado, que pueden generar pérdidas de producto el cual puede ser aprovechado mediante otro fin.

Así mismo, en la pesca industrial durante la captura de gran cantidad de peces son atrapados por pesca accidental especies de peces no comerciales o no aptos para el consumo humano, debido a características de sabor y composición, los cuales son descartados o desechados. Por otro lado en el procesamiento y transformación del pescado para obtener las diferentes presentaciones en las que se ofrece al consumidor se generan subproductos de las partes no consumibles como cabeza, colas, huesos, piel, vísceras, etc. Para el caso de la tilapia roja, ésta presenta un rendimiento de filete del 33% al 40% en relación al peso total del pez, lo que indica que el porcentaje restante es inutilizado o desechado. En un futuro la aplicación del proceso de hidrólisis usando estos recortes o subproductos de la pesca también ricos en proteína y en las situaciones en que se da sobrepesca y la demanda no sea la suficiente, es aprovechable otra fuente de materia prima para la obtención de los hidrolizados de proteína.

Teniendo en cuenta el anterior contexto y ante la amplia posibilidad de aplicación en alimentos de los hidrolizados de proteína de pescado, el presente trabajo tiene como objetivo estandarizar un procedimiento para la obtención de hidrolizado de proteína a partir de tilapia roja (*Oreochromis sp.*), un pescado de amplia producción en Colombia, evaluando las diferentes condiciones experimentales y de enzimas que afectan el proceso de obtención del hidrolizado de proteína, caracterizándolo fisicoquímicamente según sus propiedades funcionales y realizando un diseño conceptual para su obtención.

CAPITULO 1. FUNDAMENTACION

1.1 SITUACION DE LA PESCA EN COLOMBIA

Colombia desarrolla la pesca industrial en sus océanos Atlántico y Pacífico y la pesca artesanal en ambas costas, así como en aguas de ríos, lagos, lagunas, embalses, represas y canales y desde los años 80 se ha venido desarrollando la acuicultura con gran crecimiento tanto en agua dulce, como marinas.

La pesca industrial marítima Colombiana destina sus productos a la exportación y en menor medida al consumo interno, las principales especies son el atún, el camarón de aguas someras y aguas profundas, la pesca blanca como pargos, meros y chernas, pequeños peces pelágicos como carduma y plumuda, la langosta y el caracol; aunque desde el 2001 se han incrementado las capturas de otras especies oceánicas como el dorado y el calamar gigante. En el caso de la pesca artesanal marítima las especies objeto de los pescadores son el camarón de aguas someras, el atún patiseca, el pargo, la corvina, el dorado, la sierra, la picuda, el tiburón, la piangüa, la almeja, la langosta y el caracol. (FAO)

En la acuicultura continental, las especies de aprovechamiento comercial son las tilapias roja y plateada (género *Oreochromis*), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), cachamas blanca y negra (*Piaractus brachypomus* y *Colossoma macropomum*) y a menor escala el bocachico (*Prochilodus magdalenae*), la carpa (*Cyprinus carpio*) y el yamú (*Brycon spp*). Los productos de la piscicultura se destinan básicamente al mercado nacional y se desarrolla tanto a nivel comercial como de pequeña escala. (FAO)

Debido a que Colombia posee diferentes pisos térmicos, climas y microclimas relativamente constantes durante el año, la piscicultura de agua dulce se desarrolla en todo el país, con énfasis en la región Andina. Los productos pesqueros que genera Colombia se destinan en un 85% para el consumo humano, el 14,5% para uso industrial en la producción de piensos y otros productos, y el 0,5% restante son peces ornamentales y semilla para la acuicultura. La mayoría de estos productos se destinan a la exportación pues son de un alto valor comercial y el mercado interno se surte en un 65% de la producción nacional y el 35% proviene de importaciones. (FAO)

Actualmente gran cantidad de material derivado de la pesca rico en proteína es desechado o no es utilizado adecuadamente. Este material corresponde a subproductos tales como huesos, piel, viseras, escamas, aletas y algunas porciones de músculo, así mismo en muchas partes del mundo el desecho de estos subproductos generan costos adicionales debido a estrictas regulaciones. La anterior situación puede ser un punto de partida para que ésta clase de

subproductos sean utilizados como materia prima para la obtención de hidrolizados de proteína.

1.2 EL PESCADO: TILAPIA

Después de productos de importancia como el arroz, los productos forestales, la leche y el trigo, los peces contribuyen ampliamente en la producción mundial según estadísticas de la FAO. Así mismo, ofrecen un gran recurso de proteína animal disponible para los humanos, tanto en países desarrollados como en los países en vías de desarrollo, comprendiendo aproximadamente el 20% de la proteína animal para más de 2800 millones de personas. (FAO, 2008). En relación con las carnes de origen avícola y vacuno, la composición proteica en la carne de pescado es mayor.

El sector pesquero proporciona empleo a más de 200 millones de personas en todo el mundo, donde el 98% son de países en desarrollo. Actualmente la producción acuícola representa el 45% del consumo animal de alimentos marinos y se prevé que seguirá aumentando para satisfacer la demanda futura. (FAO, 2008). Desde los años 70 la producción acuícola ha crecido substancialmente contribuyendo a la seguridad alimentaria mundial, dentro de la cual la tilapia es el segundo grupo más importante de peces a nivel mundial después de las carpas chinas, con una producción en acuicultura que alcanza el 1`000.000 de toneladas métricas a partir del año 2000. (Castillo, 2001). Según estadísticas de la FAO, para el año 2007 la tilapia presentó una producción mundial de 2`505.465 toneladas, lo cual representa un valor en dólares alrededor de los 3300 millones.

Según estadísticas reportadas por el ICA, la producción de tilapia en Colombia a principios de los 90s se encontraba en 11.050 toneladas, permaneció constante hasta 1994 y para el año de 1995 tuvo un aumento considerable alcanzando una producción de 16.057 toneladas, hacia el año 1999 la producción se mantuvo en crecimiento reportando 19.842 toneladas, lo cual para ese año representaba el 46.2% de la producción acuícola nacional. Durante el año 2000 y 2001 la producción bajó en aproximadamente 9000 toneladas, pero para el año 2002 volvió a recuperarse con una producción de 15.223 toneladas, creciendo año tras año reportando al año 2006 una producción de 23.146 toneladas.

Las tilapias son el segundo grupo de peces más producidos por la acuicultura mundial, con una contribución a la producción de aproximadamente el 20% del volumen total de peces, incrementándose poco a poco desde su implementación hasta la actualidad, siendo la especie *O. niloticus* (tilapia nilótica) equivalente al 80% de la producción, seguida de la *O. mossambicus* con el 5%. (Castillo, 2001)

Dentro del género *Oreochromis*, en forma intempestiva aparece la tilapia roja como una mutación albina en un cultivo artesanal de tilapia *Oreochromis*

mossambicus de coloración normal (negra) cerca de la población de Tainan (Taiwán) en 1968 (Castillo, 2001). La tilapia roja, se convirtió en el iniciador para el desarrollo acelerado de la piscicultura comercial a partir de la década de los 80 en países suramericanos sin tradición acuícola como: Colombia (introducida en 1982), Venezuela (introducida en 1989) y Ecuador (introducida en 1993) en forma casi simultánea con países Centroamericanos, del Caribe y en Norteamérica.

La coloración atractiva de estos peces estimuló a los productores e investigadores a iniciar un acelerado programa de hibridación que permitió la obtención de nuevas líneas (strain) de tilapia roja. Las más populares, y que han sido introducidas a Colombia, son:

Tabla 1. Líneas de tilapias más populares introducidas en Colombia. (Tomado y adaptado de Castillo Campo, Luis Fernando. Tilapia Roja 2001. Una evolución de 20 años, de la incertidumbre al éxito doce años después. Cali. 2001)

LÍNEAS	ESPECIE O CRUCE
Red Singapur	<i>O. mossambicus</i> Mutante
Red Florida	<i>O. mossambicus</i> ALBINA x <i>O. urolepis hornorum</i>
Red Stirling y Tailandesa	<i>O. niloticus</i> ROJA
Red Manzala	<i>O. aureus</i> ROJA, <i>O. niloticus</i> (Egipcia) Roja
Red Yumbo No 1	Red Florida x <i>O. Niloticus</i>
Red Yumbo No 2	Red Florida USA x Red Florida ISRAEL
Golden Tilapia	<i>O. mossambicus</i> AMARILLA
Nilótica Perla	<i>O. niloticus</i> PEARLS
Red Taiwanesa	<i>O. mossambicus</i> ALBINA
Red Taiwanesa y Filipina	<i>O. mossambicus</i> ALBINA x <i>O. Niloticus</i>

En Colombia y Venezuela existía una muy fuerte oposición a la introducción y cultivo de nuevas especies de tilapia, debido a las malas experiencias con *O. mossambicus* a partir de su introducción hacia finales de los 50, la cual por falta de experiencia y una tecnología práctica para su manejo, no solo escapó de los centros de investigación hacia las corrientes superficiales cercanas, sino que las colonizó rápidamente y la especie presentó un degeneramiento que afectó su apariencia, sabor y desarrollo, ocasionando el rechazo de los consumidores y el cuestionamiento de los ecologistas, considerando además que la principal causa que afectó a las especies nativas y endémicas fue la acelerada contaminación de los cauces naturales por parte de la industrialización, asentamientos humanos, actividad agrícola y minera, siendo ésta especie una de las pocas que pudo resistir y sobrevivir al grave deterioro ambiental.

Sin embargo, a la tilapia se la ha cuestionado como un grupo potencialmente peligroso para las especies nativas, supuestamente por su capacidad depredadora, y la responsable casi directa de la desaparición de muchas de las especies nativas endémicas en algunos cauces naturales en Colombia.

Los centros de mayor producción en el país están ubicados en los departamentos de Huila-Tolima, Valle-Risaralda, Llanos orientales y Antioquia. La producción en estas zonas se hace bajo el esquema de cultivo en jaulas a alta densidad y bajo modelos de alimentación diseñados especialmente para estos sistemas. Desde estas zonas se distribuye hacia el centro del país y otras zonas no productoras.

1.3 PROPIEDADES Y APLICACIONES DE LOS HIDROLIZADOS DE PROTEINA DE PESCADO

Los subproductos de la pesca y los peces como tal son fuente valiosa de proteínas digeribles de calidad nutricional, la mayoría de estos son usados para fabricar piensos para peces y aceites de pescado debido a que el procedimiento usado ofrece un producto con buenas propiedades nutricionales, pero con pocas cualidades funcionales, restringiéndolo al uso animal y no para el consumo humano, es por eso que es necesario manejar las variables que puedan afectar el proceso de hidrólisis.

Es importante que el hidrolizado tenga buenas propiedades funcionales con el fin de utilizarlo de una forma exitosa en alimentos. El tamaño y las propiedades químicas de las proteínas hidrolizadas tienen un impacto en su funcionalidad, por lo tanto si se quiere producir un hidrolizado con propiedades mejoradas es necesario controlar la especificidad de la enzima y el grado de hidrólisis de la reacción.

Muchas de las propiedades funcionales de las proteínas se ven afectadas de forma positiva con un aumento en la solubilidad. La solubilidad de las proteínas miofibrilares se incrementa con la hidrólisis enzimática, ya que conduce a péptidos más pequeños y grupos aminos y carboxilos expuestos permitiendo una mayor interacción con el agua, estos incrementos en solubilidad y su aplicación en un rango de pH, entre 4 -8, permite la aplicación de los hidrolizados en una mayor variedad de alimentos.

Tanto la solubilidad en un amplio rango de pH, como el valor nutritivo de los hidrolizados de proteína de pescado, los convierte en una opción para producir sustitutos de leche (lactoreemplazadores) para animales destetados y como ingrediente de las formulas nutritivas para consumir como bebidas, siempre y cuando no se vea afectado el sabor. Su utilización como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas enterales con destino a la alimentación infantil y/o de adultos enfermos es de gran importancia. Estas dietas se diseñan para ser absorbidas en el intestino sin una digestión previa en el estómago y son esenciales en el tratamiento de pacientes con desórdenes estomacales o problemas de la mucosa intestinal, así como en lactantes con síndromes de malabsorción-malnutrición, con cuadros alérgicos en la mayoría de los casos. Las características que deben

cumplir los hidrolizados de proteínas para formar parte de una dieta enteral son no producir desequilibrios osmóticos ni alergias, presentar un alto valor nutritivo no muy inferior al de la proteína de partida y tener un sabor aceptable.

Otra aplicación de los hidrolizados de proteína de pescado (HPP), es como aglutinante de agua con el fin de controlar el balance agua en sistemas alimenticios y ser inyectado en productos de músculo, como carnes de cerdo, carnes de hamburguesa, filetes de pescado seco, entre otros. De esta forma podría reemplazar o sustituir de alguna manera los fosfatos que se adicionan a este tipo de productos.

Estudios también han reportado el efecto crioprotector de los HPP estabilizando proteínas a temperaturas de congelación y su habilidad para formar geles, los cuales al ser adicionados a algunos productos podrían en parte sustituir ingredientes como sacarosa o sorbitol, y dar cualidades de gel similares. (Kalidas, *et al*, 2006)

Los hidrolizados de proteína de pescado con buenas propiedades superficiales y de interfase, pueden ser usados como ingredientes para ayudar en la formación y estabilización de aceites en agua o agua en emulsiones de aceite. La especificidad de las enzimas usadas en el proceso de hidrólisis es importante ya que puede influir en el tamaño molecular y la hidrofobicidad de los péptidos generados lo cual influye en las propiedades superficiales y de interfase del HPP. En este caso es recomendable el uso de enzimas muy específicas y con un bajo grado de hidrólisis para obtener péptidos más largos y más anfipáticos.

Una de las razones de la falta de impacto en el mercado de los HPP como ingredientes de alimentos es el sabor amargo que se desarrolla durante la hidrólisis. Existe una relación entre el grado de hidrólisis, los péptidos generados y el desarrollo de la amargura, donde la formación de péptidos hidrofóbicos juega un papel importante en el desarrollo de la sensación de amargura en estos. Una medida para controlar el desarrollo del sabor amargo es un equilibrio adecuado entre la actividad exopeptidasa y endoproteasa.

La hidrólisis de las proteínas de pescado también puede llevar a potenciar el sabor a pescado, haciendo de ésta otra aplicación importante. Estudios han mostrado que una alta cantidad de aminoácidos libres en el hidrolizado lleva a un efecto potenciador del sabor. HPP con sabor concentrado pueden tener aplicación en el mercado como condimentos, salsas, sopas, en productos de mar congelados, aperitivos, entre otros, así como su aplicación en alimentos para animales como fuente de proteína.

Un ejemplo de esta aplicación, es la salsa de pescado que es el principal producto de hidrolizado de pescado obtenido mediante el uso de enzimas endógenas que

se consume en el mundo, con una producción anual de 250.000 toneladas métricas en el sureste de Asia. (Kalidas, *et al*, 2006)

Debido a la excelente fuente de proteína que representan los hidrolizados de proteína de pescado por el balance de aminoácidos, la buena digestibilidad y su rápida absorción, otra aplicación de los HPP es el uso de estos en alimentos para animales, como cerdos, aves y en formulaciones de pienso para acuicultura, adicionalmente también se ha visto como una opción para enriquecer con proteína los productos cereales y productos de panadería.

Otro uso conocido de los HPP es como fertilizante para plantas afectando el crecimiento y rendimiento de cultivo en los cuales es aplicado, además pueden estimular la expresión de fitoquímicos de valor comercial que podrían ser útiles como nutraceuticos o como antioxidantes en productos alimenticios.

Algunos de los pescados más utilizados para obtener hidrolizados y sobre los cuales se realizan variedad de estudios son el salmón, la sardina, el arenque, el bacalao, el bagre, el tiburón, el capelán, el atún, el calamar y la langosta.

1.4 PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCION

Los procedimientos idealmente deben permitir separar la proteína de los componentes no deseados e inducir propiedades deseadas. Las metodologías usadas son:

- Uso de solventes acuosos y orgánicos para extraer las proteínas.
- Acido clorhídrico concentrado o álcalis para extraer e hidrolizar las proteínas a temperaturas elevadas.
- Hidrólisis enzimática, usando enzimas endógenas o exógenas.

Los HPP son definidos como proteínas que en mayor o en menor grado son química o enzimáticamente degradadas en péptidos de diferentes tamaños.

Los dos primeros métodos normalmente afectan de forma negativa las propiedades funcionales y organolépticas de los HPP y pueden producir subproductos tóxicos.

La hidrólisis enzimática suele ser un proceso leve que resulta en productos de alta funcionalidad, buenas propiedades organolépticas y un excelente valor nutritivo sin la formación de subproductos tóxicos. Sin embargo, tiene algunos inconvenientes tales como: el costo elevado del uso de grandes cantidades de enzimas comerciales que no son reutilizables; dificultad ocasional en el control del

grado de la reacción, que puede resultar en productos heterogéneos consistente en fracciones de distinto peso molecular, baja recuperación de proteína (depende del grado de hidrólisis), y la necesidad de desactivar las enzimas por pH alto o bajo o por tratamiento con calor al final de la reacción, lo cual añade costos de transformación y puede perjudicar algunas propiedades funcionales.

Investigaciones han mostrado que aplicando tecnologías enzimáticas controladas para recuperar y modificar proteínas de pescado, es posible producir un amplio espectro de ingredientes proteínicos, con aplicaciones en alimentos, farmacéutica y en industrias de alimentos especializados y de fertilizantes. (Kalidas, *et al*, 2006)

Los procesos post-hidrólisis son necesarios para controlar el tamaño molecular y la reducción o eliminación del sabor amargo de los hidrolizados. La ultrafiltración es el procedimiento más eficaz para eliminar los péptidos y las proteínas de alto peso molecular. Algunas otras técnicas para ocultar o reducir el sabor amargo son tratamientos con carbón activado o con absorbentes sintéticos.

1.5 FACTORES DEL PROCESO

Además del proceso de hidrólisis, existen una serie de factores que necesitan considerarse antes, durante y después del proceso. Entre estos están la naturaleza y calidad de la materia prima, la enzima escogida y las condiciones de pH.

Materia prima: Es importante ya que puede tener un impacto en el proceso de hidrólisis y en la calidad y funcionalidad del producto final, algunos puntos a tener en cuenta con respecto a la materia prima son:

- Especies con carne magra o grasa, porque las últimas pueden generar problemas de oxidación de lípidos en el producto final, creando olores y sabores desagradables.
- Materias primas con alta cantidad de sangre y músculos oscuros, pueden estar ligadas con problemas de oxidación y coloración durante el procesamiento y producto final debido a los niveles de lípidos de membrana y pro oxidantes como hemo proteínas y algunos metales.

Para los anteriores casos, de materiales ricos en lípidos, sangre y músculos oscurecidos, un tratamiento con pH alcalino, podría reducir los problemas de oxidación y de color, sin embargo éste tipo de tratamiento puede ocasionar un deterioro microbiano más acelerado. La adición de agentes antioxidantes y antimicrobianos al principio del procesamiento puede controlar parcialmente el problema, dependiendo de la calidad de la materia prima. La oxidación de los lípidos es una de las principales causas de deterioro en la calidad en los productos de mar.

- Otros componentes de los pescados, tales como huesos, piel y tejido conectivo pueden interferir con el proceso de hidrólisis y contaminar el producto final, afectando su calidad y funcionalidad. Para fines experimentales un buen material de partida podría ser un filete de pescado, libre de estos componentes.

Enzima: Debido a la especificidad de las enzimas, en el proceso de hidrólisis se pueden generar productos de diferente composición molecular y propiedades funcionales.

La elección de la enzima y su composición está basada en la combinación de eficacia y costo de la enzima, así como la especificidad por el sustrato. Las enzimas proteolíticas pueden tener una actividad endopeptidasa, exopeptidasa, o ambas, lo cual puede tener impacto en la velocidad de la hidrólisis y en las propiedades de los péptidos formados.

- Las enzimas endopeptidasas son a menudo muy específicas, rompiendo los enlaces peptídicos al interior de la proteína generando péptidos pequeños, pero muy pocos aminoácidos libres. En general entre menos específica es la enzima, más pequeños son los péptidos que se generan.
- Las exopeptidasas por otro lado, cortan los aminoácidos de los extremos de la cadena polipeptídica, resultando en mezclas de aminoácidos libres y largas fracciones peptídicas.
- Comúnmente, una combinación de actividad endo y exopeptidasa, favorece el proceso hidrolítico. Por esto el uso de enzimas comerciales ofrece mejores resultados que el uso de enzimas endógenas, pues permite un mejor control de la hidrólisis y por ende de los productos resultantes.

Entre las enzimas estudiadas en la hidrólisis de proteínas, se encuentra la pepsina. Se ha encontrado que esta enzima es bastante eficiente, pero solo es activa a niveles de pH ácidos, lo cual puede afectar las propiedades funcionales del producto final como la calidad oxidativa y el color, pues a pH bajos la oxidación lipídica se da rápidamente, aunque un factor positivo es que el manejar el proceso hidrolítico a estos niveles de pH controla el crecimiento microbiano. Otra enzima muy popular para producir HPP, es la Alcalasa, una enzima alcalina con actividad endo y exopeptidasa, que ha mostrado una buena recuperación de proteína.

Tabla 2. Ejemplos de enzimas usadas para hidrolizar proteína de pescado. (Tomado y adaptado de Food Microbiology. 2da Edición. Taylor y Francis Group. 2006. Capítulo 2.23)

ENZIMA	RANGO pH	RANGO T (°C)	ESPECIFICIDAD	ORIGEN
Alcalasa 2.4L	6.5 -8.5	55 -70	Endo	<i>Bacillus licheniformis</i>
Flavourzyme 1000L			Endo & Exo	<i>Aspergillus oryzae</i>
Neutrasa 0.5L	5.5 -7.5	45 -55	Endo	<i>Bacillus subtilis</i>

Protamex	5.5 -7.5	35 – 60	Endo & Exo	
Corolasa7089	5 -7.5	<60	Endo	<i>Bacillus subtilis</i>
Corolasa PN-L	5 – 8	<50	Endo & Exo	<i>Aspergillus sojae</i>
Corolasa LAP	6 – 9	<70	Exo	<i>Aspergillus sojae</i>
Acido Proteasa II	3 – 5	40 – 50	N/A	<i>Rizopuz niveus</i>
Proteasa P “Amano” 6	5 – 9	40 – 50	N/A	<i>Aspergillus melleus</i>
Proteasa M “Amano”	3 – 6	40 – 60	N/A	<i>Aspergillus oryzae</i>
Papaina	5 – 7	65 – 80	Endo & Exo	Papaya
Bromelina	3 – 9	50 – 60	Endo & Exo	Piña
Pepsina	1.5 – 2.5	35 – 50	Endo	Estomago de animal
Pancreatina	7.5 – 8.5	35 – 50	Endo & Exo	Pancreas de animal

CAPITULO 2. MATERIALES Y METODOS

2.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Según fichas técnicas de las enzimas comerciales con la que se realizó el estudio, y reportes de publicaciones científicas, se planteo el siguiente diseño experimental para la etapa de la hidrólisis enzimática:

ENZIMA	MUESTRA PROTEINA	pH inicial	T (°C) reacción	CONCENTRACION* (0.02% /0.11% /0.2%)	REPLICAS	T (min)	INACTIVACION ENZIMA
PROTEX 26L	20ml	3.0	50	0.004 ml	Replica 26L 1	90	Por encima de 55°C a pH 3.5
					Replica 26L 2		
				0.022 ml	Replica 26L 3		
					Replica 26L 4		
				0.04 ml	Replica 26L 5		
					Replica 26L 6		
PROTEX 6L	20ml	9.5	60	0.004 ml	Replica 6L 7	90	De 5 a 10 min. a 80 – 85°C
					Replica 6L 8		
				0.022 ml	Replica 6L 9		
					Replica 6L 10		
				0.04 ml	Replica 6L 11		
					Replica 6L 12		
PROTEX 51FP	20ml	7.5	50	0.004ml	Replica 51FP 13	90	Por 10 min. a 90°C
					Replica 51FP 14		
				0.022 ml	Replica 51FP 15		
					Replica 51FP 16		
				0.04 ml	Replica 51FP 17		
					Replica 51FP 18		
PROTEX P	20ml	8.5	60	0.004 ml	Replica P 19	90	Por 15 min. a 85°C (Según gráfica de temperatura)
					Replica P 20		
				0.022 ml	Replica P 21		
					Replica P 22		
				0.04 ml	Replica P 23		
					Replica P 24		

*Concentración: 0.02% (0.2g ó ml E/Lt muestra), 0.11% (0.11g ó ml E/Lt muestra), 0.2% (2g ó ml E/Lt muestra)

Para la dosificación de las enzimas, se realizó una dilución 1/99 en agua destilada obteniendo un solución enzimática con una concentración al 1%, de la cual se tomaron 0.396 ml para una concentración final de 0.02%, 2.178 ml para 0.11% y 3.96 ml para 0.2%.

2.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.2.1 Pretratamiento de la muestra:

1. El filete de pescado llegó al laboratorio congelado en su empaque original. (Producto: Filete de Tilapia Antillana x 450g)

2. El pescado se desempacó y los filetes se ubicaron en un recipiente con hielo, se sometieron a tres lavados con un volumen de agua fría 1:2 (w:v) (c/uno de 5min) y se ubicaron de nuevo sobre la cama de hielo hasta que fueron utilizados. (Imagen 1).
3. Se separó una muestra de filetes de 500g aproximadamente, se empacaron en dos bolsas herméticas, se rotularon y se llevaron a congelación (-18°C), para posteriormente realizarle pruebas de contenido de proteína y como contramuestra.



Imagen 1. Lavado de filetes con agua fría

2.2.2 Preparación de la muestra para hidrólisis:

1. Los filetes (900g) se trocearon y se mezclaron con agua destilada en una relación 1:1 (w:v), se homogenizó la mezcla licuándola en una licuadora domestica durante 60s, obteniendo una mezcla de 1800ml aproximadamente. (Imagen 2, 3 y 4)
2. Se midió el pH de la mezcla. (Imagen 5)
3. Se separó una parte de la mezcla (500g), se empacó en una bolsa hermética, se rotuló y se llevó a congelación para dejar como contramuestra.
4. La mezcla restante se dividió en cuatro partes (250g c/u) y se ajustó al pH de reacción de cada una de las cuatro enzimas con las cuales se trabajó (3, 7.5, 8.5 y 9.5) con NaOH 0.1N y HCL 0.1N, justo antes de llevar a cabo la reacción. (Imagen 5)



Imagen 2. Troceado de los filetes

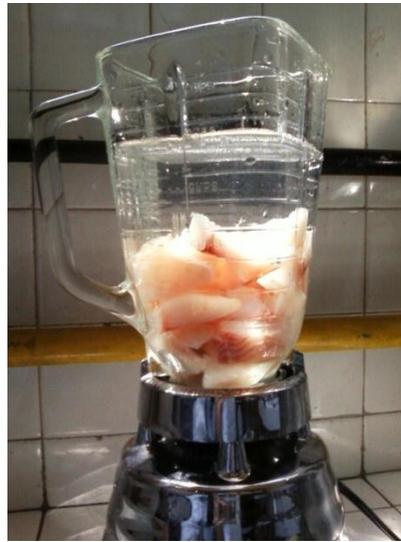


Imagen 3. Homogenización del pescado en agua



Imagen 4. Mezcla de pescado



Imagen 5. Medición y ajuste de pH de la mezcla

2.2.3 Hidrólisis enzimática:

1. Las enzimas Protex 6L, Protex 26L, Protex 51FP y Protex P de Genencor International, fueron proporcionadas al trabajo por Merquiand Ltda.
2. Para cada porción de mezcla con el pH ajustado a la actividad de la enzima correspondiente. Se ubicaron 20ml de la mezcla en 6 tubos de vidrio por cada enzima. (Imagen 6)
3. Se realizó una dilución 1/99 de cada enzima en agua destilada obteniendo un solución enzimática con una concentración al 1%, de la cual se tomaron 0.396 ml para obtener una concentración final de 0.02%, 2.178 ml para 0.11% y 3.96 ml para 0.2%.
4. Se adicionaron por duplicado a los tubos de vidrio la cantidad de enzima correspondiente a las tres concentraciones a evaluar (0.02, 0.11 y 0.2%).
5. Cada tubo se agito durante 30s para permitir la homogenización de la enzima y la mezcla de pescado.
6. Los 6 tubos se ubicaron en un soporte de icopor y se pusieron en un baño termostatado ISOTEMP 1013P de Fisher Scientific, a la temperatura de reacción de la enzima correspondiente (50 y 60°C). (Imagen 7 y 8)
7. Se dejó correr la reacción enzimática durante el tiempo establecido (90min)
8. Transcurrido el tiempo de reacción se inactivó la enzima según indicaciones técnicas para cada enzima respectivamente, se retiraron los tubos del equipo y se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. (Imagen 9)

9. La mezcla se llevó a centrifugación a 3000rpm por 15 min en la centrifuga Rotofix 32 de Hettich Zentrifugen. El sobrenadante se recolectó en tubos de vidrio, se cerraron herméticamente, se rotularon y se llevaron a refrigeración a 0°C. El pelet también se recolectó y se almaceno. (Imagen 10)



Imagen 6. Mezcla de pescado en tubos para reacción enzimática

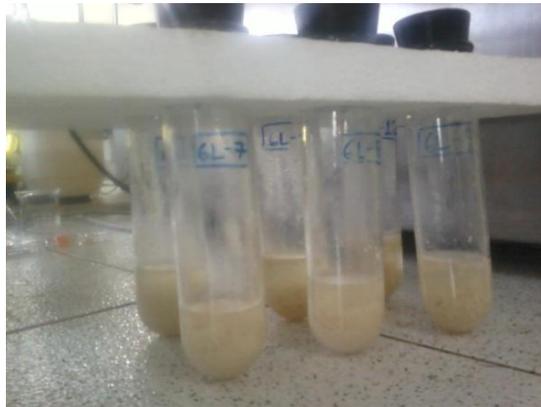


Imagen 7. Tubos de reacción en soporte de icopor



Imagen 8. Reacción enzimática en baño con termostato

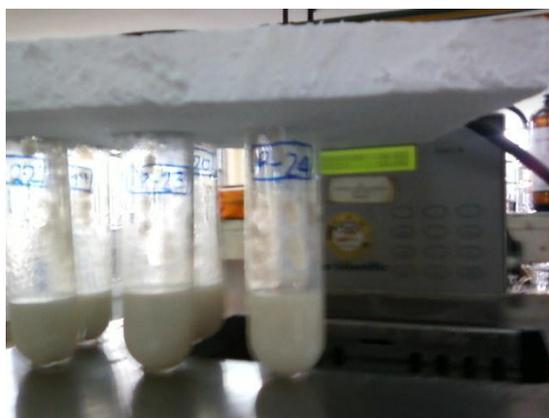


Imagen 9. Tubos de ensayo finalizada la reacción



Imagen 10. Hidrolizados y pelet de centrifugados empacados

2.2.4 Determinación de propiedades funcionales:

A) Propiedad emulsificante:

1. Se mezclaron 10 ml de aceite vegetal (mazorca) y 30 ml de una solución del hidrolizado al 1% (v/v). (0,3 ml del hidrolizado en 30 ml de agua destilada)
2. La mezcla se homogenizó a 5.000 rpm durante 3 min, usando la centrifuga HERMLE Z200A de Hermle Labortechnik.
3. Se pipetearon alícuotas de la emulsión (50ul) del fondo del tubo a los 0 y 10 min.
4. Se mezclaron con 5ml de SDS 0.1% (0,1 g de SDS en 100ml de agua destilada)
5. Se midió la absorbancia a 500nm a los 0 y 10 min, en el espectrofotometro Genesys 20 de Thermo Scientific. (Imagen 11 y 12)
6. Se calculo el índice de actividad emulsionante (EAI) y el índice de estabilidad de la emulsión (ESI)

$$EAI (m^2/ml) = (2 \times 2.303 \times A_{500}) / (0.25 \times \text{cantidad proteína (ml)})$$

$$ESI (min) = A_0 \times \Delta t / \Delta A$$

Donde $A = A_0 - A_{10}$ y $Dt = 10 \text{ min}$



Imagen 11. Medición absorbancia para determinación propiedad emulsificante



Imagen 12. Lectura espectrofotómetro

B) Solubilidad:

1. Se tomaron 0.2ml del hidrolizado y se disolvieron en 20 ml de agua destilada. Para obtener una solución al 1%.
2. La mezcla se puso en baño maría con agitación entre 25 a 28°C durante 30 min, usando el equipo 1024 Shaking bath de Tecator.
3. La mezcla se centrifugo a 4000rpm por 30 min, usando la centrifuga HERMLE Z200A de Hermle Labortechnik.
4. La fracción soluble (sobrenadante) se separo y se analizo por el método de Kjeldahl.
5. Digestión: 1 ml de sobrenadante + 10 ml de H₂SO₄ + 3 g de catalizador (Imagen 13 y 14)
6. La destilación y la titulación fue llevada a cabo en el ICTA, quienes entregaron los valores de volumen de HCL utilizado en la titulación para cada muestra.
7. Se calculo la solubilidad de proteína

Solubilidad de proteína (%) = (Cont. Proteína sobrenadante/Cont. Proteína Total muestra) X 100



Imagen 13. Digestión de muestras para determinación de proteína



Imagen 14. Muestras digeridas

CAPITULO 3. RESULTADOS

3.1 EL HIDROLIZADO

Para las cuatro enzimas evaluadas se obtuvo un hidrolizado con características similares. En general, se obtuvo un líquido transparente, sin embargo para el caso de Protex51FP, el hidrolizado tuvo un color amarillento en la menor concentración de enzima evaluada (0.02%) que fue tornando a transparente con el aumento de la concentración. (Imagen 15)

El aspecto era grasoso, con la presencia de pequeñas burbujas de grasa en la superficie. El HPP no presento olor característico a pescado en el momento de su recuperación después de la reacción enzimática, pero pasado aproximadamente un mes el olor a pescado se intensifico, lo cual podría indicar que el sabor también.

Partiendo para todas las replicas del ensayo de 20 ml de mezcla de pescado, se obtuvo una mayor cantidad de sobrenadante en la concentración de 0.2% para las cuatro enzimas y una menor cantidad de éste en la menor concentración de 0.02% y por ende mayor cantidad de residuos (pelet).



Imagen 15. Hidrolizados obtenidos con enzima Protex 51FP

3.2 PROPIEDAD EMULSIFICANTE

Solución hidrolizado al 1%

Tabla. 3 Resultados de absorbancia para tiempo cero A(0) y a los 10 minutos A(10), valores de actividad emulsionante (EAI) y valores de estabilidad de la emulsión (ESI)

Replica	A (0)	A (10)	EAI(m ² /ml)	ESI(min)
Protex 26L 1	0,048	0.035	2.947	36.92
Protex 26L 2	0.044	0.034	2.702	44
Protex 26L 3	0.056	0.039	3.439	32.94
Protex 26L 4	0.058	0.034	3.561	24.16
Protex 26L 5	0.036	0.040	2.210	-90
Protex 26L 6	0.036	0.038	2.210	-180
Protex 6L 7	0.036	0.033	2.210	120
Protex 6L 8	0.035	0.032	2.149	116.66
Protex 6L 9	0.040	0.037	2.456	133.33
Protex 6L 10	0.036	0.034	2.210	180
Protex 6L 11	0.038	0.037	2.333	380
Protex 6L 12	0.044	0.037	2.702	62.85
Protex 51FP 13	0.048	0.037	2.947	43.63
Protex 51FP 14	0.049	0.033	3.009	30.62
Protex 51FP 15	0.060	0.037	3.684	26.08
Protex 51FP 16	0.061	0.037	3.746	25.41
Protex 51FP 17	0.061	0.034	3.746	22.59
Protex 51FP 18	0.062	0.037	3.807	24.8
Protex P 19	0.033	0.027	2.026	55
Protex P 20	0.036	0.028	2.210	45
Protex P 21	0.031	0.028	1.903	103.3
Protex P 22	0.029	0.026	1.780	96.66
Protex P 23	0.034	0.029	2.088	68
Protex P 24	0.034	0.030	2.088	85

INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIONANTE V.S. CONCENTRACIÓN

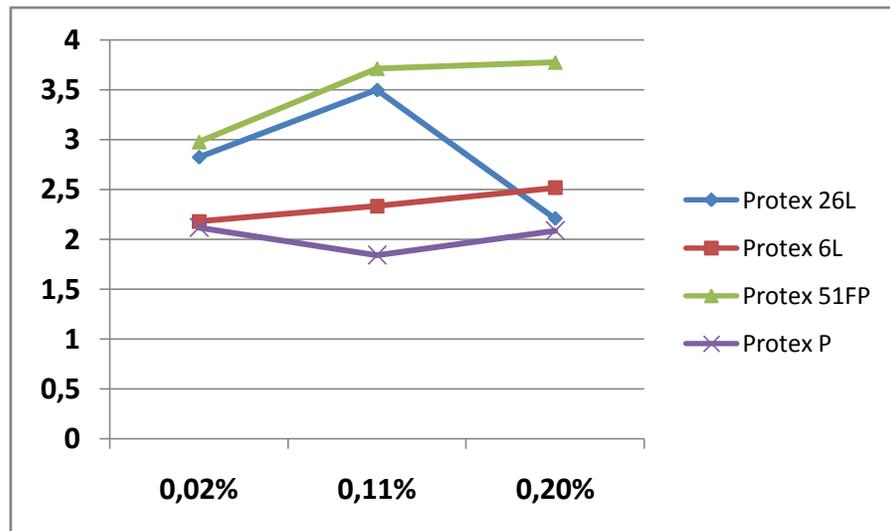


Gráfico 1. Valores promedio de EAI (m²/ml) de los hidrolizados obtenidos con las cuatro enzimas a las concentraciones evaluadas

3.3 SOLUBILIDAD

Solución hidrolizado 1%

Tomando como densidad del hidrolizado la densidad del agua 1 g/cm³ y el volumen de muestra analizada fue 1 ml, tenemos que la masa de la muestra es de 1g.

El % de proteína de la mezcla de pescado fue de 15.19%

Tabla 4. Valores de % solubilidad de proteína para los hidrolizados obtenidos con las cuatro enzimas a las concentraciones evaluadas.

Replica	% Proteína (sln. 1%)	% Solubilidad de proteína
Protex 26L 1	0.211	1.389
Protex 26L 2	0.168	1.105
Protex 26L 3	0.168	1.105
Protex 26L 4	0.253	1.665
Protex 26L 5	0.168	1.105
Protex 26L 6	0.084	0.552
Protex 6L 7	0.126	0.829
Protex 6L 8	0.168	1.105

Protex 6L 9	0.211	1.389
Protex 6L 10	0.126	0.829
Protex 6L 11	0.253	1.665
Protex 6L 12	0.253	1.665
Protex 51FP 13	0.168	1.105
Protex 51FP 14	0.168	1.105
Protex 51FP 15	0.168	1.105
Protex 51FP 16	0.168	1.105
Protex 51FP 17	0.168	1.105
Protex 51FP 18	0.168	1.105
Protex P 19	0.253	1.665
Protex P 20	0.253	1.665
Protex P 21	0.295	1.942
Protex P 22	0.337	2.218
Protex P 23	0.295	1.942
Protex P 24	0.168	1.105

SOLUBILIDAD V.S. CONCENTRACIÓN

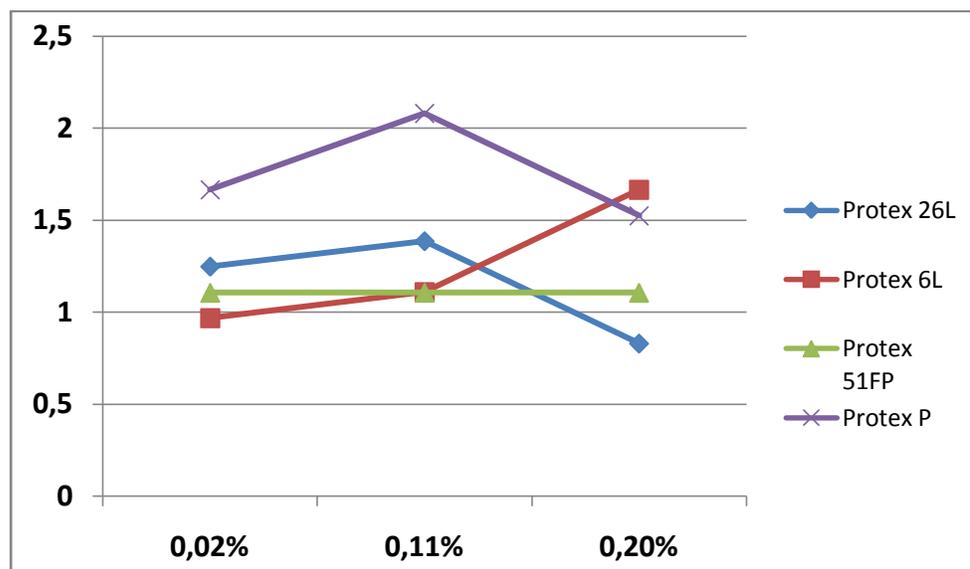


Gráfico 2. Valores promedio de % solubilidad de los hidrolizados obtenidos con las cuatro enzimas a las concentraciones evaluadas

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El modelo estadístico a seguir es:

$$Y = \mu + E_i + C_{ij} + R_{ijk}$$

Donde μ es la media de las replicas, E_i la respuesta a la enzima, C_{ij} la respuesta a la concentración de la enzima y R_{ijk} las propiedades funcionales del hidrolizado evaluadas.

El objetivo del modelo es estimar el efecto de los tratamientos (enzima y concentración), mediante los promedios de cada tratamiento y probar las hipótesis estadísticas.

Se realizó un análisis de varianza con el fin de probar las hipótesis al anterior modelo:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$$

$$H_a: \mu_i \neq \mu_j, \quad i \neq j$$

Primero se hará una comparación entre los tratamientos (concentraciones) para cada enzima, con base en los valores de propiedad emulsificante (EAI) y la solubilidad respectivamente. Con el fin de determinar si la concentración de la enzima tiene efecto sobre la propiedad funcional.

A) Propiedad emulsificante:

Protex 26L	T1 (0.02%)	T2 (0.11%)	T3 (0.2%)
Replica 1	2.947	3.439	2.210
Replica 2	2.702	3.561	2.210

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	F _{5%}	F _{1%}
Tratamientos	2	1,673	0,8365	68,008**	9,5521	30,816
error	3	0,037	0,0123			
total	5	1,71				

- **Se rechaza la hipótesis nula**, es decir que se encontraron diferencias altamente significativas entre las concentraciones de enzima Protex 26L, para obtener un hidrolizado con actividad emulsionante.
- % C.V = 3.89%, El coeficiente de variación señala que la técnica experimental de laboratorio fue adecuada o se ajusta a los requerimientos exigidos por los métodos científicos.

- Al realizar una hidrólisis con la enzima Protex 26L, la concentración de reacción al **0.11%** es la que genera un hidrolizado con la mejor actividad emulsionante.

Protex 6L	T1 (0.02%)	T2 (0.11%)	T3 (0.2%)
Replica 1	2.210	2.456	2.333
Replica 2	2.149	2.210	2.702

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	F5%	F1%
Tratamientos	2	0,1218	0,0609	1,823	9,5521	30,816
error	3	0,1002	0,0334			
total	5	0,222				

- **No se rechaza la hipótesis nula**, es decir que no se encontraron diferencias altamente significativas entre las concentraciones de enzima Protex 6L, para obtener un hidrolizado con actividad emulsionante.
- % C.V = 7.79%, El coeficiente de variación señala que la técnica experimental de laboratorio fue adecuada o se ajusta a los requerimientos exigidos por los métodos científicos.
- Al realizar una hidrólisis con la enzima Protex 6L, la concentración de reacción de la enzima no tiene efecto sobre la actividad emulsionante de los hidrolizados obtenidos, por lo cual si se trabaja con ésta enzima se puede optar por usar la concentración mínima optimizando costos y obteniendo los mismos resultados.

Protex 51FP	T1 (0.02%)	T2 (0.11%)	T3 (0.2%)
Replica 1	2.947	3.684	3.746
Replica 2	3.009	3.746	3.807

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	F5%	F1%
Tratamientos	2	0,7903	0,3951	207,94**	9,5521	30,816
error	3	0,0057	0,0019			
total	5	0,796				

- **Se rechaza la hipótesis nula**, es decir que se encontraron diferencias altamente significativas entre las concentraciones de enzima Protex 51FP, para obtener un hidrolizado con actividad emulsionante.

- % C.V = 1.25%, El coeficiente de variación señala que la técnica experimental de laboratorio fue adecuada o se ajusta a los requerimientos exigidos por los métodos científicos.
- Al realizar una hidrólisis con la enzima Protex 51FP, la concentración de reacción al **0.2%** es la que genera un hidrolizado con la mejor actividad emulsionante, sin embargo la concentración al 0.11% también ofrece un hidrolizado con propiedad emulsionante alta.

Protex P	T1 (0.02%)	T2 (0.11%)	T3 (0.2%)
Replica 1	2.026	1.903	2.088
Replica 2	2.210	1.780	2.088

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	F5%	F1%
Tratamientos	2	0,0935	0,04675	5,729	9,5521	30,816
error	3	0,0245	0,00816			
total	5	0,118				

- **No se rechaza la hipótesis nula**, es decir que no se encontraron diferencias altamente significativas entre las concentraciones de enzima Protex P evaluadas, para obtener un hidrolizado con actividad emulsionante.
- % C.V = 4.48%, El coeficiente de variación señala que la técnica experimental de laboratorio fue adecuada o se ajusta a los requerimientos exigidos por los métodos científicos.
- Al realizar una hidrólisis con la enzima Protex P, la concentración de reacción de la enzima no tiene efecto sobre la actividad emulsionante de los hidrolizados obtenidos, por lo cual si se trabaja con ésta enzima se puede optar por usar la concentración mínima analizada (0.02%).

B) Solubilidad:

Protex 26L	T1 (0.02%)	T2 (0.11%)	T3 (0.2%)
Replica 1	1.389	1.105	1.105
Replica 2	1.105	1.665	0.552

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	F5%	F1%
Tratamientos	2	0,3392	0,1696	1,453	9,5521	30,816
error	3	0,3501	0,1167			
total	5	0,6893				

- **No se rechaza la hipótesis nula**, es decir que no se encontraron diferencias altamente significativas entre las concentraciones de enzima Protex 26L, para obtener un hidrolizado con propiedad de solubilidad.
- % C.V = 29.6%, El coeficiente de variación señala que la técnica experimental de laboratorio no fue adecuada pues en ensayos de experimentación se aceptan valores por debajo del 15%. Se debe revisar la metodología usada en laboratorio para que los valores obtenidos sean confiables.
- Al realizar una hidrólisis con la enzima Protex 26L, la concentración de reacción de la enzima no tiene efecto sobre la solubilidad de los hidrolizados obtenidos.

Protex 6L	T1 (0.02%)	T2 (0.11%)	T3 (0.2%)
Replica 1	0.829	1.389	1.665
Replica 2	1.105	0.829	1.665

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	F5%	F1%
Tratamientos	2	0.544	0.272	4,184	9,5521	30,816
error	3	0.195	0.065			
total	5	0.739				

- **No se rechaza la hipótesis nula**, es decir que no se encontraron diferencias altamente significativas entre las concentraciones de enzima Protex 6L, para obtener un hidrolizado con propiedad de solubilidad.
- % C.V = 20.44%, El coeficiente de variación muestra que la técnica experimental de laboratorio no fue adecuada. Se debe revisar la metodología usada en laboratorio para que los valores obtenidos sean confiables.
- Al realizar una hidrólisis con la enzima Protex 6L, la concentración de reacción de la enzima no tiene efecto sobre la solubilidad de los hidrolizados obtenidos.

Protex 51FP	T1 (0.02%)	T2 (0.11%)	T3 (0.2%)
Replica 1	1.105	1.105	1.105
Replica 2	1.105	1.105	1.105

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	F5%	F1%
Tratamientos	2	0	0	0	9,5521	30,816
error	3	0	0			
total	5	0	0			

- **No se rechaza la hipótesis nula**, todos los valores generados por los diferentes tratamientos son iguales es decir que no se encontraron diferencias entre las concentraciones de enzima Protex 51FP, para obtener un hidrolizado con propiedad de solubilidad.
- % C.V = 0%, El coeficiente de variación muestra que la técnica experimental de laboratorio fue adecuada.
- Al realizar una hidrólisis con la enzima Protex 51FP, la concentración de reacción de la enzima no tiene efecto sobre la solubilidad de los hidrolizados obtenidos, es decir que puede ser aplicada cualquiera de las tres concentraciones evaluadas para un obtener un hidrolizado con las mismas características de solubilidad.

Protex P	T1 (0.02%)	T2 (0.11%)	T3 (0.2%)
Replica 1	1.665	1.942	1.942
Replica 2	1.665	2.218	1.105

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	F5%	F1%
Tratamientos	2	0.335	0.1675	1.295	9,5521	30,816
error	3	0.388	0.1293			
total	5	0.723				

- **No se rechaza la hipótesis nula**, es decir que no se encontraron diferencias altamente significativas entre las concentraciones de enzima Protex P, para obtener un hidrolizado con propiedad de solubilidad.
- % C.V = 20.47%, El coeficiente de variación muestra que la técnica experimental de laboratorio no fue adecuada. Se debe revisar la metodología usada en laboratorio para que los valores obtenidos sean confiables.
- Al realizar una hidrólisis con la enzima Protex P, las concentraciones de reacción de la enzima evaluadas no tienen efecto sobre la solubilidad de los hidrolizados obtenidos, aunque el mayor valor de solubilidad fue obtenido en la concentración intermedia de 0.11%.

Tabla 5. Consolidado de análisis de varianza para las diferentes concentraciones evaluadas con cada enzima

PROPIEDAD ENZIMA	EMULSIFICACION	SOLUBILIDAD
PROTEX 26L	<i>Rechaza Ho:</i> Si hay diferencias entre las concentraciones	<i>No Rechaza Ho:</i> No hay diferencias entre las concentraciones
PROTEX 6L	<i>No Rechaza Ho:</i> No hay diferencias entre las concentraciones	<i>No Rechaza Ho:</i> No hay diferencias entre las concentraciones
PROTEX 51FP	<i>Rechaza Ho:</i> Si hay diferencias entre las concentraciones	<i>No Rechaza Ho:</i> No hay diferencias entre las concentraciones
PROTEX P	<i>No Rechaza Ho:</i> No hay diferencias entre las concentraciones	<i>No Rechaza Ho:</i> No hay diferencias entre las concentraciones

Segundo, se realizó una análisis de varianza general para los tratamientos aplicados, es decir cada enzima a cada concentración se tomo como un tratamiento, lo cual dio doce tratamientos en total; cuatro enzimas por tres concentraciones cada una, con el objetivo de ver si existían diferencias al obtener un hidrolizado con capacidad emulsificante si se comparaban todas las enzimas.

Tratamiento	Nº	r1	r2
P26L 0,02%	1	2.947	2.702
P26L 0,11%	2	3.439	3.561
P26L 0,2%	3	2.210	2.210
P6L 0,02%	4	2.210	2.149
P6L 0,11%	5	2.456	2.210
P6L 0,2%	6	2.333	2.702
P51FP 0,02%	7	2.947	3.009
P51FP 0,11%	8	3.684	3.746
P51FP 0,2%	9	3.746	3.807
PP 0,02%	10	2.026	2.210
PP 0,11 %	11	1.903	1.780
PP 0,2%	12	2.088	2.088

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc	F5%	F1%
Tratamientos	11	76,967	6,997	499,78**	2,7743	4,3398
error	12	0,169	0,014			
total	23	77,136				

- **Se rechaza la hipótesis nula**, es decir que se encontraron diferencias altamente significativas entre las concentraciones de las cuatro enzimas evaluadas para obtener un hidrolizado con capacidad emulsificante.
- % C.V = 15.37%, El coeficiente de variación se encuentra en el límite para determinar que la técnica experimental de laboratorio fue adecuada.

Tercero, se realizó una comparación entre grupos de tratamientos (concentraciones) para las enzimas, con base en los valores de propiedad emulsificante (EAI). Con el fin de determinar si las enzimas tienen efecto sobre la propiedad funcional, a través de un análisis de varianza por contrastes.

El contraste a evaluar fue: Tratamientos con enzima Protex 26L contra tratamientos con enzima Protex 51FP, ya que en el análisis de varianza para las dos enzimas se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones para obtener un hidrolizado con capacidad emulsificante y fue con estas enzimas con las cuales se obtuvieron los mayores valores de EAI.

Grupo	Total	n	SCC	CMC	Fc	F5%	F1%
Protex 26L	17,069	6	1,248	1,248	889,14**	4,74	9,33
Protex 51FP	20,939	6					

- **Se rechaza la hipótesis nula**, en este caso quiere decir que existen diferencias altamente significativas entre los dos grupos de tratamientos evaluados, ósea entre las enzimas Protex 26L y Protex 51FP al ser usadas para obtener un hidrolizado con capacidad emulsificante.
- Al comparar los promedios de los valores de EAI generados con las dos enzimas, el de Protex 51FP (3.48) es mayor que el de Protex 26L (2.84), por lo que se sugeriría usar la enzima Protex 51FP.

3.5 ACTIVIDAD ENZIMATICA

Teniendo en cuenta los resultados del análisis estadístico, se trabajo con la enzima Protex 51FP la cual arrojó los mejores resultados en la obtención de un hidrolizado con capacidad emulsificante. Se determinó la actividad enzimática de la enzima con base en el método número C303-00, ensayo: Acid Protease, HU Activity, brindado por Genencor International.

Se realizaron unas pequeñas modificaciones al método:

- El substrato de hemoglobina se preparo 2g en 200ml, a diferencia del método que uso 4g en 100ml, para lograr la completa homogenización de la hemoglobina.
- Se tomaron dos puntos más en la curva estándar de tirosina, para concentraciones de tirosina de 0.60 mM y 0.70 mM.
- Las diluciones de enzima utilizadas se determinaron con base en las mediciones del Espectrofotómetro a 275nm.
- El volumen de reacción se ajusto a un total de 7 ml.

Diluciones de enzima:

- 1gr de enzima en 100ml = 1%
- 1ml de solución de enzima al 1% en 100ml = 0.01%
- Se adicionaron 1.8ml de solución al 0.01% para una concentración final de [0.0025%], 1.4 ml para [0.002%], 1ml para [0.0014%], 0.8ml para [0.0011%], 0.4ml para [0.00057%] y 0.2ml para [0.00028%].

Diseño de trabajo:

Tabla 6. Procedimiento de trabajo para determinación de actividad enzimática

Paso	Bs	Be	1 [0.0025]	2 [0.002]	3 [0.0014]	4 [0.0011]	5 [0.00057]	6 [0.00028]
Muestra (Enzima)	-	2.0ml	1.8ml	1.4ml	1ml	0.8ml	0.4ml	0.2ml
Buffer acetato	2.0ml	-	0.2ml	0.6ml	1ml	1.2ml	1.6ml	1.8ml
Incubar 5 min a 40°C								
Substrato HE	2.5ml	-	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
Incubar 30 min a 40°C								
ATA 14%	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml
Substrato HE	-	2.5ml	-	-	-	-	-	-
Reposar 60 min a temperatura ambiente								
Centrifugar								
Leer a 275 nm contra buffer acetatos								

Tabla 7. Resultados valores de curva de calibración de tirosina por duplicado

[] mM	Abs – R1	Abs – R2	Abs - promedio
0.10	0.150	0.150	0.150
0.20	0.302	0.303	0.3025
0.30	0.456	0.421	0.4385
0.40	0.589	0.563	0.576
0.50	0.746	0.738	0.742
0.60	0.912	0.883	0.8975
0.70	1.061	1.059	1.06

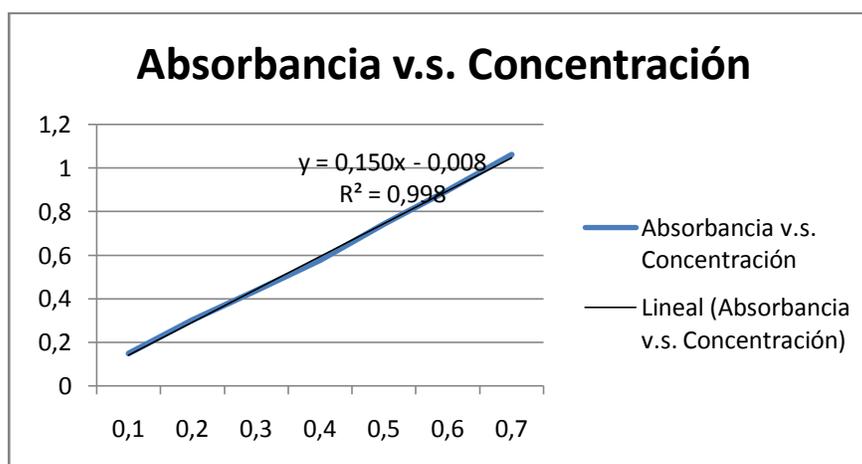


Gráfico 3. Curva de calibración de tirosina

Tabla 8. Resultados de absorbancia de las muestras evaluadas

Muestra	Abs.	- Bs	- Be	Promedio
Bs	1.070	-	-	-
Be	-	0.230	-	-
0.2 –R1	-	0.305	0.075	0.104
0.2 –R2	-	0.363	0.133	
0.4 –R1	-	0.552	0.322	0.324
0.4 –R2	-	0.556	0.326	
0.8 –R1	-	1.035	0.805	0.8185
0.8 –R2	-	1.062	0.832	
1.0 –R1	-	1.140	0.910	0.8865
1.0 –R2	-	1.093	0.863	
1.4 –R1	-	1.403	1.173	1.107
1.4 –R2	-	1.271	1.041	
1.8 –R1	-	1.448	1.218	1.2405
1.8 –R2	-	1.493	1.263	

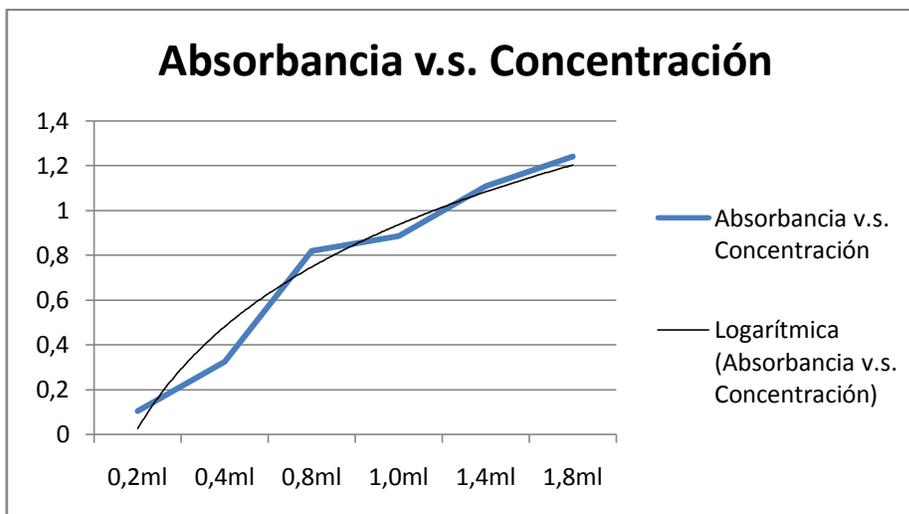


Grafico 4. Curva de absorbancia contra concentración de muestras problema

Determinación de Actividad:

$$\text{Actividad (HU/g)} = [(\text{delta abs} - \text{intercepto}) * \text{dilución} * 7 * 147.9] / \text{Wt} * \text{T} * \text{S}$$

Donde,

7 = volumen final en ml de mezcla incubada

147.9 = tirosina a conversión HU

Wt = peso de la muestra en dilución final (gramos por 2 ml)

T = tiempo de incubación en minutos

S = pendiente de la curva de tirosina

Tabla 9. Valores de actividad (HU/g) para las muestras analizadas de enzima Protex 51FP

Muestra	Concentración enzima (%)	Absorbancia	Actividad (HU/g)
0.2	0.00028	0.104	$3.09 * 10^{-3}$
0.4	0.00057	0.324	0.0207
0.8	0.0011	0.8185	0.0935
1.0	0.0014	0.8865	0.1414
1.4	0.002	1.107	0.2528
1.8	0.0025	1.2405	0.3544

CAPITULO 4. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La obtención de un hidrolizado de proteína con una composición final que permita una amplia aplicación y usos con base en sus propiedades funcionales, dependerá entre otros factores de la fuente de proteína, la enzima proteolítica utilizada, las condiciones de reacción y del grado de hidrólisis alcanzado.

En el presente trabajo, fue escogida como fuente de proteína el pescado debido a que es una fuente valiosa de proteínas digeribles de calidad nutricional. Se trabajó con la tilapia roja (*Oreochromis sp.*) por su fácil acceso en el mercado colombiano y porque no se encontraron reportes de este tipo en esta especie de pescado, que además de tener una amplia producción en diferentes zonas de Colombia, es un pez de tipo demersal, en el cual su musculo blanco presenta un menor contenido de grasa y tejido conectivo y una mayor concentración de proteína.

Durante el proceso experimental para la obtención del hidrolizado a partir de los filetes de tilapia roja se realizó un pretratamiento de los filetes a través de un blanqueado o lavado con agua fría de los músculos el cual es necesario para lograr la solubilización de las proteínas miofibrilares y obtener propiedades funcionales deseadas en el hidrolizado como son la solubilidad, la capacidad emulsificante, la capacidad de retención de agua y la capacidad gelificante. En diferentes estudios se ha encontrado que la solubilidad de estas proteínas se incrementa con la hidrólisis enzimática, ya que lleva a la formación de péptidos más pequeños y grupos aminos y carboxilos expuestos, permitiendo una mayor interacción con el agua. (Kalidas, *et al*, 2006).

La mezcla de proteína se realizó en una proporción 1:1 de filetes de pescado y agua con el fin de lograr una buena homogenización, permitiendo que la enzima tenga un fácil acceso a las proteínas. La cantidad de agua añadida es una importante variable en el proceso de hidrólisis, menos agua no sólo puede disminuir la hidrólisis debido a la falta de acceso de la enzima a los sustratos, sino también la alta viscosidad de la mezcla puede conducir a una menor recuperación de las proteínas hidrolizadas. (Kalidas, *et al*, 2006)

El diseño experimental planteado mostro buenos resultados en la obtención de los hidrolizados. Para cada enzima evaluada se tuvo en cuenta estrictamente las condiciones de reacción como temperatura, pH y forma de inactivación de la enzima, especificadas en las fichas técnicas de cada enzima. El control de estas variables es importante para el buen desempeño de las enzimas durante la reacción de hidrólisis, así como su especificidad.

Sin embargo para el caso del pH de reacción, durante el desarrollo del trabajo ésta condición solo fue ajustada en la mezcla de sustrato inicial y no se monitoreo

durante la reacción. Si el proceso de hidrólisis no se controla, el pH de la solución cambiará después del inicio de la hidrólisis debido a la formación de grupos aminos nuevos, los cuales son capaces de liberar o aceptar protones, dependiendo del pH de la hidrólisis. A un pH bajo todos los grupos amino están protonados y solamente parte de los grupos carboxilo están desprotonados, resultando en una captación neta de protones por cada enlace peptídico roto, causando un incremento del pH. A pH neutro y alcalino la hidrólisis resulta en una disminución de pH, pues todos los carboxilos están desprotonados y solamente parte de los grupos amino están protonados. (Benítez R., *et al.* 2008). Con el fin de prevenir un cambio de pH durante la hidrólisis que pueda afectar el desempeño de la enzima, es recomendable llevar a cabo la reacción en un sistema buffer.

El tiempo de reacción escogido para todas las enzimas fue de 90 minutos, este tiempo se determinó con base en reportes bibliográficos donde se realizaron reacciones de hidrólisis en productos de origen hidrobiológico.

Las enzimas con las cuales se trabajó fueron proporcionadas por la empresa Merquiand Ltda., quienes entregaron muestras de cuatro proteasas de aplicación industrial. La especificidad de las enzimas usadas en el proceso de hidrólisis es importante ya que puede influir en el tamaño molecular y la hidrofobicidad de los péptidos generados lo cual interviene en las propiedades superficiales y de interfase del HPP. (Benítez R., *et al.* 2008)

Las enzimas utilizadas fueron Protex 51FP, Protex 26L, Protex6L y Protex P. La enzima Protex 6L es una proteasa bacteriana alcalina derivada de *Bacillus licheniformis* y entre sus aplicaciones se encuentra la hidrólisis de proteínas como el pescado. La enzima Protex 51FP es un complejo endo/exo peptidasa derivada de *Aspergillus arizae var.*, entre sus aplicaciones típicas se encuentra la hidrólisis de pescados sólidos. La enzima Protex P es una subtilisina derivada de un cultivo genéticamente modificado de *Bacillus subtilis*, la cual incluye en sus aplicaciones el procesamiento de proteínas. Finalmente la enzima Protex 26L es una endopeptidasa ácida fúngica derivada de una fermentación controlada de un cultivo seleccionado de *Aspergillus niger*, la cual es caracterizada por producir hidrolizados de proteína bajo condiciones de pH ácido.

La variable del trabajo fue la concentración de las enzimas, para cada enzima se evaluaron tres concentraciones diferentes (0.02%, 0.11% y 0.2%), la elección de las concentraciones a evaluar se tomó con base en la ficha técnica de la enzima Protex 51FP, que era para la única enzima que daba unas recomendaciones de aplicación en porcentaje de concentración para la dosificación de la enzima. La ficha técnica recomendaba un rango entre 0.02 – 0.2% basado en el peso del sustrato de proteína. Se escogió entonces evaluar la concentración mínima y la máxima del rango y una intermedia para las cuatro enzimas, por duplicado. La elección de estas concentraciones se hizo para observar el efecto de las concentraciones en la obtención de un hidrolizado con propiedades funcionales,

es decir, si los valores de capacidad emulsificante y la solubilidad, que fueron las dos propiedades evaluadas en el trabajo, variaban al usar diferentes concentraciones de enzima.

La hidrólisis enzimática se llevo a cabo en un baño termostataado para asegurar la temperatura de reacción, el pH fue ajustado al sustrato de proteína antes de agregar la solución de enzima, el tiempo de reacción se controló con cronometro y pasado el tiempo se llevo a cabo la inactivación de la enzima según las indicaciones de la ficha técnica para cada enzima, ya fuera por temperatura o cambio en el pH.

Después de la reacción las proteínas hidrolizadas fueron recuperadas por centrifugación para separarlas de las partes insolubles; como la grasa, los residuos de hueso, tejido conectivo y la proteína no hidrolizada. Las proteínas hidrolizadas (sobrenadante) fueron empacadas en tubos de vidrio, sellados y se mantuvieron en refrigeración hasta el desarrollo de los análisis de propiedades funcionales.

La hidrólisis proteolítica no se desarrolla en una sola reacción, son un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces. Estudios han propuesto un proceso de hidrólisis constituido por tres reacciones consecutivas. Primero, la formación de un complejo enzima-sustrato (proteína), y después la ruptura del enlace amídico dando como resultado la liberación de un péptido. Finalmente, el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El proceso puede reiniciarse sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno solo de ellos. (Benítez R., *et al.* 2008)

Los hidrolizados obtenidos para las tres concentraciones evaluadas por duplicado por enzima se sometieron a ensayos, para la determinación de capacidad emulsificante y solubilidad, estas fueron las dos propiedades funcionales que se decidió analizar por la disponibilidad de tiempo durante el desarrollo del trabajo y porque fue de las que mayor información de referencia se encontró.

Los métodos de determinación de la capacidad emulsionante y la solubilidad fueron escogidos con base en un matriz de procedimientos que se elaboro, al consolidar la información obtenida de diferentes fuentes bibliográficas.

En la determinación de la capacidad emulsificante se midió la absorbancia de la emulsión a los 0 y 10 minutos y por medio de dos formulas se calculo el índice de actividad emulsionante (EAI) y el índice de estabilidad de la emulsión (ESI). Los valores de capacidad emulsificante (EAI), denotan la cantidad máxima de aceite que es emulsificada bajo condiciones especificas por una cantidad estándar de proteína. (Pearce, 1978). Los valores de actividad emulsionante (m²/ml) determinados se encontraron entre valores de 1 y 4 (Tabla 3). Estos fueron usados para el análisis de varianza, en cual se evaluó el efecto de las

concentraciones (tratamientos) en la obtención de un hidrolizado con esta propiedad funcional, para cada enzima.

Para los hidrolizados obtenidos con las enzimas Protex 26L y Protex 51FP se encontraron diferencias altamente significativas entre las concentraciones evaluadas, esto quiere decir que si se aplica una solución de enzima con una concentración de 0.02%, 0.11% o 0.2% el hidrolizado obtenido con cada solución va a ofrecer diferentes características en cuanto a su aplicación como emulsificante. Sin embargo, los HPP obtenidos con la enzima Protex 51FP presentaron mayores valores de EAI, siendo el mayor valor alcanzado cuando se utilizó la enzima a concentración de 0.2%. Los anteriores resultados pueden deberse al carácter de la enzima endo/exo peptidasa, lo cual le permite romper la proteína en el interior formando pequeños fragmentos peptídicos, como romper en el exterior o en las esquinas de la cadena llevando a la formación tanto de cadenas largas de péptidos como de aminoácidos libres.

Para el caso de las enzimas Protex 6L y Protex P no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones, esto quiere decir que si se utiliza ya sea una enzima u otra independientemente de las concentraciones los valores de capacidad emulsificante de los hidrolizados obtenidos no variarían, en este caso la mejor opción sería utilizar la menor concentración evaluada (0.02%), con la cual se obtiene un hidrolizado con la misma capacidad de emulsificante.

Según la comparación por contrastes en la cual se evaluó la capacidad emulsificante de los HPP obtenidos con las enzimas Protex 26L y Protex 51FP, con las cuales se obtuvieron los valores más altos de EAI, se puede sugerir el uso de la enzima Protex 51FP a una concentración de 0.2%.

En la determinación de la propiedad de solubilidad, se midió la solubilidad de una solución de hidrolizado al 1% en agua a 28°C, a través del método Kjeldahl por determinación del nitrógeno en la muestra. Los valores de solubilidad obtenidos (Tabla 4) se dan en porcentaje y se encontraron entre 0.5 y 2.5. Estos valores fueron usados para realizar el análisis de varianza donde se evaluó el efecto de las concentraciones (tratamientos) en la obtención de un hidrolizado con solubilidad, para cada enzima.

En el punto isoeléctrico (pI) de la proteína, la solubilidad generalmente aumenta con la hidrólisis, ya que es principalmente el resultado de la reducción en peso molecular y del aumento en el número de grupos polares. (Slattery, 1998)

Para las cuatro enzimas utilizadas no se encontraron diferencias altamente significativas entre las diferentes concentraciones evaluadas, esto quiere decir que independientemente de la concentración que se utilice para cada enzima, el hidrolizado obtenido mantendrá unas características de solubilidad similares. Por lo cual en este caso lo ideal sería la utilización de la menor concentración de

enzima evaluada (0.02%), pues se obtendría un HPP con solubilidad y económicamente sería mejor.

Al observar la gráfica 2, vemos que los mayores valores de porcentaje de solubilidad son alcanzados cuando se utiliza la enzima Protex P sobre las demás enzimas, por lo cual se recomendaría el uso de esta enzima si se desea obtener un HPP con propiedad de solubilidad.

Debido a que los valores de coeficiente de variación determinados para los ensayos con las cuatro enzimas son altos, y muestran un procedimiento experimental no confiable. No se realizaron más análisis estadísticos con los valores obtenidos y la determinación de actividad enzimática se desarrollo con base en los resultados de propiedad emulsificante.

Es necesaria la revisión del ensayo para la determinación de esta propiedad. Posiblemente la solución de hidrolizado utilizada en el ensayo, tenía una concentración muy baja (1%), y la cantidad de nitrógeno presente en la muestra no era la suficiente para una determinación por el método de Kjeldahl, donde es necesario la realización de titulaciones para cuantificar la concentración de nitrógeno, llevando a errores experimentales.

Con base en los resultados estadísticos, se escogió la enzima Protex 51FP, por su desempeño en la obtención de un hidrolizado con capacidad emulsificante para realizar la determinación de la actividad enzimática, con el fin de establecer la actividad de la enzima en HU (unidades de hemoglobina). Se desarrolló el protocolo referenciado por el fabricante (Genencor International), en el cual usando un sustrato de hemoglobina bovina, se llevó a cabo la hidrólisis proteolítica y la hemoglobina solubilizada fue cuantificada. Se analizaron diferentes concentraciones de enzima, entre 0.00028% y 0.0025%, esto permitió determinar a las concentraciones dadas las unidades HU/g de sustrato (Tabla 9). Una unidad de hemoglobina (HU/g) se refiere a la actividad que produce en un minuto, bajo condiciones especificadas, un hidrolizado cuya absorbancia a 275 nm es la misma que la de una solución que contenga 1uM/L de tirosina en 6mM/L de acido tricloroacético. A partir de los valores de la tabla 9, es posible establecer las unidades de hemoglobina para las concentraciones de enzima utilizadas durante la hidrólisis enzimática de los filetes de pescado.

Una de las razones de la falta de impacto en el mercado de los HPP como ingredientes de alimentos es el sabor amargo que se desarrolla durante la hidrólisis. Existe una relación entre el grado de hidrólisis, los péptidos generados y el desarrollo de la amargura, donde la formación de péptidos hidrofóbicos juega un papel importante en el desarrollo de la sensación de amargura en estos. Una medida para controlar el desarrollo del sabor amargo es un equilibrio adecuado entre la actividad exopeptidasa y endoproteasa. (Kalidas, *et al*, 2006). Este equilibrio puede ser logrado mediante el uso de un complejo enzimático que brinde

la actividad exo y endo peptídica, como en el caso de la enzima escogida Protex 51FP, en este caso sería recomendable la aplicación de pruebas sensoriales, con el fin de determinar la amargura en el hidrolizado, para su aplicación en alimentos.

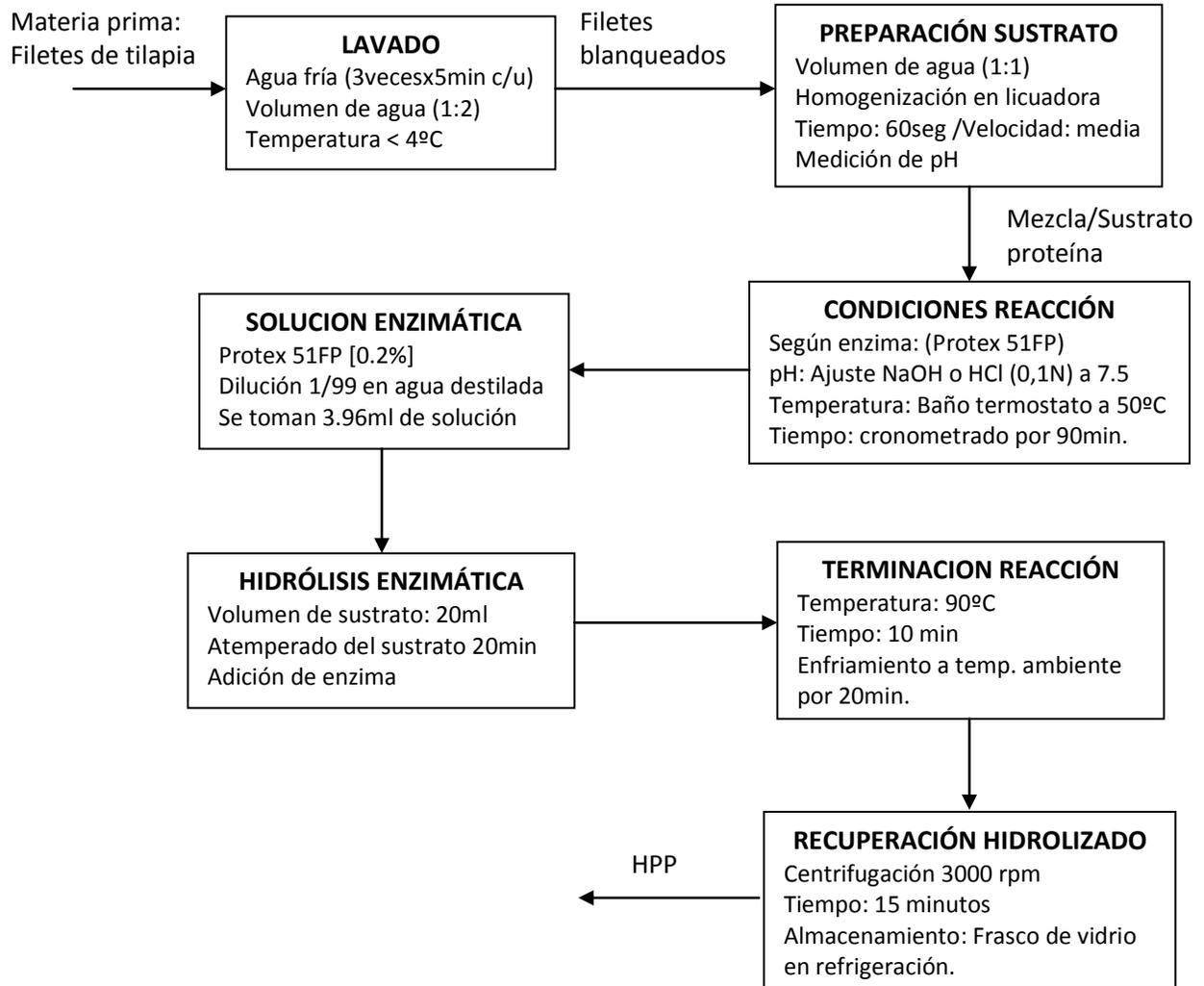
4.1 DISEÑO CONCEPTUAL PROCEDIMIENTO

Con base en el diseño experimental desarrollado y los diferentes resultados obtenidos se determina un diseño conceptual o procedimiento en el cual se muestran los pasos y condiciones o requerimientos en cada uno de estos para la obtención de un hidrolizado de proteína de pescado a partir de tilapia roja, para aplicación en alimentos con base en las propiedades de solubilidad y capacidad emulsificante.

- a) *Materia prima:* Se debe realizar una selección del tipo de materia prima o sustrato que se va a usar en el proceso de obtención del hidrolizado, en este caso el músculo de pescado de tilapia roja (filetes), o si se va a trabajar con subproductos pesqueros.
- b) *Lavado:* El proceso de lavado o blanqueado de los filetes se hace necesario con el fin de solubilizar las proteínas de interés, que son las proteínas miofibrilares las cuales al ser solubles en agua quedan expuestas para ser hidrolizadas por la enzima. Es necesario controlar algunas variables en este paso del proceso, como son la temperatura del agua la cual debe mantenerse fría, por debajo de los 4°C para mantener la cadena de frío, así mismo el número de lavados recomendados según bibliografía es de 3 veces y el tiempo de permanencia de los filetes en el agua puede variar entre 1 minuto y 10 minutos, en nuestro caso se determinó usar 5 minutos debido al tamaño y cantidad de los filetes. El volumen de agua usado en los lavados se mantuvo en una proporción 1:2 filetes de pescado:agua.
- c) *Preparación del sustrato:* La preparación del sustrato consiste primero en el corte de los filetes en fragmentos, los cuales son luego homogenizados en una licuadora doméstica con agua destilada. Este paso es importante, pues la obtención de una mezcla homogénea permitirá que la enzima tenga un fácil acceso a las proteínas. El volumen de agua utilizado es en una proporción 1:1 trozos de pescado:agua. El tiempo de homogenización en la licuadora es de 60s a velocidad media. Finalmente se debe medir el pH inicial de la mezcla, pues es una de las condiciones que se debe controlar.
- d) *Ajuste de condiciones de reacción:* Las condiciones de reacción óptimas de la enzima con la que se va a trabajar deben ser ajustadas antes de aplicar la enzima en el sustrato, pues de esto depende el buen desempeño de la enzima durante la reacción. El pH se debe ajustar con NaOH o HCl (0,1N) hasta alcanzar el pH de reacción indicado en la ficha técnica de la enzima. La temperatura de reacción también se debe tener en cuenta, para esto se usa un baño maría o baño termostático donde se fija la temperatura y se

controla durante la reacción. El tiempo de reacción debe ser determinado antes de iniciar la reacción y es cronometrado desde el momento en el que se adiciona la enzima. Para obtener un hidrolizado con propiedades de capacidad emulsificante se escogió la enzima Protex 51FP de Genencor International. Las condiciones de reacción para esta enzima son pH de 7.5, temperatura de 50°C y tiempo de reacción 90 minutos.

- e) *Solución enzimática:* Según la enzima con la cual se va a trabajar se debe escoger una concentración de la enzima que será aplicada al sustrato de proteína. Si la cantidad es muy pequeña, lo ideal es realizar una dilución de la enzima en agua destilada para evitar errores de pipeteado y para que la enzima pueda mezclarse más fácilmente con el sustrato. Para la enzima Protex 51FP la concentración adecuada a utilizar es de 0.2%. Para esto se debe realizar una dilución 1/99 en agua destilada obteniendo un solución enzimática con una concentración al 1%, de la cual se toman 3.96 ml para una concentración final de 0.2% en volumen de sustrato de 20ml.
- f) *Hidrólisis enzimática:* Teniendo listo el sustrato de proteína y la solución enzimática preparada, solo falta montar la reacción y dejarla correr. En los tubos de reacción se ponen 20ml del sustrato de proteína, los cuales son atemperados en el baño termostato durante 20 minutos hasta alcanzar la temperatura de reacción fijada. Se toma el volumen establecido de solución enzimática (3.96 ml para Protex 51FP) y se adiciona al tubo con el sustrato, mientras se agita suavemente, en este momento se inicia el tiempo de reacción, el cual es de 90 minutos.
- g) *Terminación de la reacción:* Cuando la hidrólisis a llegado al punto final deseado en el proceso, es terminada por inactivación de las enzimas con altas temperaturas, o reduciendo o aumentando el pH, o una combinación de ambos. Pasados los 90 minutos la enzima es desactivada según especificaciones de la ficha técnica, para Protex 51FP se subió la temperatura a 90°C y se mantuvo así por 10 minutos. Después de desactivada la enzima, los tubos deben ser retirados del baño termostato y se deben dejar enfriar a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos.
- h) *Recuperación hidrolizado:* Las proteínas hidrolizadas son recuperadas por centrifugación, para separarlas de las partes insolubles. El hidrolizado se lleva a un tubo de centrifuga y se somete a 3000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante se puede recuperar en un frasco de vidrio, el cual es sellado herméticamente, se debe rotular e identificar y ser mantenido en refrigeración hasta su uso. Para tiempos prolongados de almacenamiento es recomendable la liofilización del hidrolizado.



CAPITULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Fue posible la obtención de un hidrolizado con características de capacidad emulsificante y solubilidad tras la evaluación de cuatro proteasas y diferentes concentraciones de reacción, para estudios posteriores se recomienda la determinación de la viabilidad de la aplicación de este tipo de hidrolizados en alimentos y las dosificaciones.
- Para un mejor desempeño de la enzima a las condiciones de reacción, se puede atemperar el sustrato de proteína a la temperatura de reacción durante unos minutos en el baño maría antes de aplicar la solución de enzima.
- Con el fin de obtener resultados más confiables y aumentar el coeficiente de variación en la determinación de solubilidad, se recomienda realizar los análisis de kejdahl usando una solución de hidrolizado mayor al 1%.
- Para la determinación del porcentaje de solubilidad, es necesario usar en la relación el contenido de nitrógeno obtenido en la solución de hidrolizado solubilizada contra la misma solución de hidrolizado sin solubilizar y no contra el contenido de nitrógeno en la mezcla de pescado original.
- Para estudios posteriores es recomendable realizar la determinación de las propiedades funcionales de solubilidad y capacidad emulsificante a un hidrolizado de proteína obtenido a partir de otra materia prima, como por ejemplo de una fuente vegetal como la soya y poder comparar así el hidrolizado obtenido a partir de pescado contra hidrolizados obtenidos de fuentes de las cuales se conocen algunas aplicaciones según sus propiedades funcionales.

BIBLIOGRAFIA

AURREKOETXEA, G., Perera, MN. Aprovechamiento de recursos pesqueros infrautilizados para la obtención de alimentos mejorados de peces de acuicultura. Revista AquaTIC, nº 13, Mayo, 2001.

BAEK, HH. y Cadwallader, KR. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. Journal of Food Science. 1995, Vol. 60 (5), p. 929-935.

BELEN CD., Moreno AM., Garcia, D., *et al.* Caracterización de un hidrolizado proteico enzimático obtenido del pez caribe colorado (*Pygocentrus cariba humboldti*, 1821). INCI. 2007, Vol. 32 (3), p.188-194.

BENITEZ, Ricardo; IBARZ, Albert y PAGAN, Jordi. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquím. clín. latinoam.* [online]. 2008, Vol.42, n.2 [citado 2010-04-24], p. 227-236.

CASTILLO Campo, Luis F. Tilapia Roja 2001. Una evolución de 20 años, de la incertidumbre al éxito doce años después. Cali. 2001

CHALAMAIAH M., *et al.* Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. Food Chemistry. 2009, 120, p. 652 - 657

ESPEJO Gonzalez, Carlos. Cultivo de tilapia roja en jaulas. Tecnología en Colombia. Bogotá. 1999.

GUADIX, A.; Guadix, E. M. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica.* 2000, Vol. 41:1; p. 79-89.

KALIDAS, S. Paliyath, G. Pometto, A y Levin R. Food Biotechnology. 2da Edición. Taylor y Francis Group. 2006. Capitulo 2.23

KLOMPONG V., Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chemistry. 2007, Vol 102, p. 1317-1327

PACHECO-Aguilar R., Mazorra-Manzano, M., Ramírez-Suárez JC., Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a comercial proteasa. Food Chemistry, 2008, Vol 109 (4, 15), p. 782 – 789.

PEARCE, KN., Kinsella JE. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *J.Agric. Food Chem*, 1978, Vol. 26, No. 3, p. 716 -723.

Seguridad alimentaria mundial: Los desafíos del cambio climático y la bioenergía. Día Mundial de la Alimentación. 16 de Octubre de 2008. FAO

SLATTERY H, Fitzgerald RJ. Functional properties and bitterness of sodium caseinate hydrolysates prepared with a *Bacillus* proteinase. *J Food Sci* 1998, Vol 63, p. 418-22.

THIANSILAKUL, Y. *et al.*, Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruads*). *Food Chemistry*. 2007, Vol 103, p.1385 – 1394

http://www.fao.org/fishery/countrysector/FI-CP_CO/es, consultada el 16 de Enero de 2010

<http://www.ica.gov.co/getdoc/09b7ef4f-c691-4fd0-80b5-3800e762c497/Estadisticas.aspx>, consultada el 16 de Enero de 2010