

20/1/65



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

OBTENCION DE UN HIDROLIZADO DE PROTEINA DE PESCADO A PARTIR DE LISA (Mugil cophalus) Y DETERMINACION DE SU VALOR NUTRICIONAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA: GABRIEL MARTINEZ FLORES

TESIS CON FALLA DE CALIDAD

MEXICO, D. F.

1989



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Resumen.....	1
Capitulo 1.....	1
Introducción.....	1
1.1 Industria pesquera.....	1
1.1.1 Captura.....	1
1.2 El pescado como fuente de proteína.....	4
1.3 Harinas de pescado.....	6
1.4 Concentrados de proteína de pescado.....	7
1.5 Aislados de proteína de pescado.....	8
1.6 Hidrolizados de proteína de pescado.....	9
1.7 Enzimas proteolíticas industriales.....	10
1.7.1 Propiedades de las enzimas.....	11
1.7.1.1 Tipo de enzima.....	12
1.7.1.2 pH.....	12
1.7.1.3 Temperatura.....	12
1.7.1.4 Activadores e inhibidores.....	12
1.7.1.5 Disponibilidad.....	13
1.7.1.6 Apoyo técnico.....	13
1.7.1.7 Costo.....	13
1.8 Propiedades de la enzima seleccionada.....	13
1.9 Uso de las enzimas proteolíticas comerciales.....	14
1.10 Materias primas para el proceso de hidrólisis.....	14
1.11 Usos de los HPP en alimentos.....	15

1.12	Usos potenciales (aplicaciones) de los HPP.....	16
1.12.1	Substitutos de leche para becerros.....	16
1.12.2	Proteínas alternativas para procesos industriales..	16
1.13	Empleo futuro de los HPP.....	16
1.14	Justificación.....	17
1.15	Hipótesis.....	18
1.16	Objetivos.....	18
	 Capítulo 2.....	19
	Materiales y métodos.....	19
2.1	Materias primas.....	19
2.1.1	Pescado.....	19
2.1.2	Enzimas proteolíticas.....	19
2.1.2.1	Actividad.....	20
	Procedimiento.....	22
2.1.2.2	Curvas de inactivación.....	23
2.1.2.3	Temperatura y pH óptimos.....	24
2.1.2.4	Determinación de la concentración de enzima y del tiempo de hidrólisis óptimos.....	24
2.2	Análisis.....	26
2.2.1	Proteína cruda.....	26
2.2.2	Materia seca.....	26
2.2.3	Grasa.....	26
2.2.4	Cenizas.....	26
2.2.5	Determinación de proteína soluble.....	27
2.2.5.1	A nivel laboratorio.....	28
2.2.5.2	A nivel planta piloto.....	28

2.2.6	Determinación de la proteína por el método de indofenol.....	28
2.2.6.1	Procedimiento.....	28
2.2.7	Curva estándar de sulfato de amonio.....	29
2.3	Producción de HPP a nivel planta piloto.....	30
2.3.1	Experimento 1.....	30
2.3.2	Experimento 2.....	31
2.4	Análisis microbiológicos.....	32
2.5	Determinación del valor nutricional del HPP obtenido en el laboratorio piloto.....	34
2.5.1	Animales.....	34
2.5.2	Dietas.....	35
2.5.3	Parámetros nutricionales.....	38
2.5.3.1	Ganancia de peso (GP).....	38
2.5.3.2	Tasa de conversión alimenticia (TCA).....	38
2.5.3.3	Coeficiente de eficacia proteica (PER).....	38
2.5.3.4	Coeficiente de utilización proteica (NPR).....	38
2.5.3.5	Digestibilidad aparente del nitrógeno (DAN).....	39
2.6	Diseño experimental y análisis estadístico de los resultados.....	39
	Capítulo 3.....	41
	Resultados y discusión.....	41
3.1	Selección de materia prima.....	41
3.2	Determinación de las condiciones de hidrólisis a escala laboratorio.....	43
3.2.1	Selección de la enzima.....	43
3.2.2	Efecto de la temperatura y del tiempo sobre la actividad proteolítica residual de HT-Proteolytic-200.....	47

3.3	Selección de un método de determinación de proteína soluble.....	48
3.4	Efecto de la concentración de enzima sobre la hidrólisis de proteína de pescado.....	50
3.5	Hidrólisis en planta piloto.....	54
3.6	Análisis microbiológico del HPP.....	56
3.7	Determinación del valor nutricional del HPP.....	57
3.7.1	Experimento 1.....	57
3.7.2	Experimento 2.....	59
	Conclusiones.....	61

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Distribución de la captura destinada a procesos industriales (miles de toneladas de materia prima).....	2
Cuadro 2	Evolución de los precios de diversas proteínas en la industria (\$000/Kg de proteína).....	3
Cuadro 3	Contenido de aminoácidos esenciales en algunas proteínas comparadas con el patrón de requerimientos sugerido por la FAO (mg de aminoácidos por gramo de proteína).....	5
Cuadro 4	Información de diversas proteasas comerciales.....	20
Cuadro 5	Diseño experimental utilizado para estudiar el efecto del tiempo y la temperatura de preincubación sobre la actividad residual de HT-Proteolytic-200.....	23
Cuadro 6	Diseño experimental para determinar la actividad proteolítica de HT-Proteolytic-200.....	25
Cuadro 7	Formulación y composición química de las dietas durante el experimento 1.....	36
Cuadro 8	Dietas preparadas para medir el efecto de suplementación de L-lisina sobre el HPP producido en la planta piloto del I.I.B.H.....	37
Cuadro 9	Composición de las especies Lisa, Sardina y Anchoqueta (%).....	42
Cuadro 10	Costo actual de proteínas de diversas fuentes.....	43
Cuadro 11	Resultados de las actividades de diversas proteasas comerciales (U.H.) sobre caseína a 40 y 55°C.....	44
Cuadro 12	Costos por Kg y por unidad de actividad de enzimas proteolíticas comerciales.....	45
Cuadro 13	Información técnica acerca de HT-Proteolytic-200.....	46
Cuadro 14	Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la actividad residual de HT-Proteolytic-200.....	47
Cuadro 15	Valores de nitrógeno soluble (%) obtenidos en experimentos de hidrólisis con pescado fresco entero por diversos métodos analíticos.....	49

Cuadro 16	Efecto del tiempo y concentración de HT-Proteolytic-200 sobre la solubilización de proteína de pescado.....	51
Cuadro 17	Resultados de Ganancias de peso (GP); Ingestión (Ing); Conversión alimenticia (TCA); Eficacia proteica (PER); Utilización neta de proteína (NPR) y Digestibilidad aparente del nitrógeno (DAN) en el experimento 1.....	57
Cuadro 18	Ganancias de peso (GP), Ingestión (Ing), Conversión alimenticia (TCA), Eficacia proteica (PER), Utilización neta de proteína (NPR) y Digestibilidad aparente del nitrógeno (DAN) en el Experimento 2.....	59

ABREVIATURAS

cal	calorías
CPP	Concentrado de proteína de pescado
HPP	Hidrolizado de proteína de pescado
L	litro *
M	Molar
mL	mililitro *
min	minutos
ton	toneladas

RESUMEN

Se desarrolló un proceso de hidrólisis enzimática para la elaboración de un concentrado de proteína de pescado soluble en agua. Se midió la actividad de diversas proteasas comerciales sobre un sustrato de caseína. Se seleccionó la enzima que tuvo menor costo por unidad de actividad y cuyo pH de máxima actividad fuera neutro.

Se le determinaron a esta enzima curvas de actividad sobre un sustrato de pescado fresco eviscerado. Una concentración de proteasa de 0.5% (p/p) y un tiempo de 3 horas resultaron en una solubilidad de 65% de la proteína inicial.

Las curvas de recuperación de proteína soluble para los niveles de concentración ensayados fueron ajustadas por regresión. Los modelos obtenidos mostraron que la hidrólisis se realiza siguiendo un comportamiento de segundo orden con respecto al tiempo de reacción y a la concentración de enzima.

El escalamiento a planta piloto mostró que las condiciones de reacción encontradas en el laboratorio son aplicables en niveles de producción de mayor escala.

La evaluación nutricional de la proteína de pescado hidrolizada indicó que su valor nutritivo es comparable al de la caseína láctea.

El uso de calor en las distintas etapas del proceso, no afectan la biodisponibilidad de la lisina de la proteína de pescado.

CAPITULO I

I N T R O D U C C I O N

I Industria pesquera.1.1 Captura.

La industria pesquera mexicana se encuentra entre las 12 primeras del mundo por el volumen de su captura. El potencial de esta industria es grande debido principalmente a la extensión de sus litorales (10,143 Km) y a la existencia de una infraestructura adecuada para la captura y transformación de la pesca. Se han reportado capturas de 1,357 mil ton. y 1,465 mil ton. de pescado vivo y pesos desembarcados de 1,177 mil ton. y 1,281 mil ton. para 1986 y 1987 respectivamente. De la captura total, en 1987, el 61.5% (788 mil ton.) se dirigió al consumo humano directo (pescado fresco, enlatado y congelado) y el 38.5% (493 mil ton.) al consumo humano indirecto, en forma de harinas de pescado usadas como suplemento proteico en forrajes para la alimentación de ganado (Cuadro 1) (3).

Cuadro 1. Distribución de la captura destinada a procesos industriales (miles de toneladas de materia prima).

	1986	1987	Variación 87/86 (%)
Consumo humano directo	722	788	+ 8.4
Fresco	460	526	+12.5
Congelado	142	148	+ 4.1
Enlatado	120	114	- 5.3
Consumo humano indirecto	455	493	+ 7.7
Reducción (harinas)	450	487	+ 7.6
Otros procesos	5.1	6.8	+24.2
Captura total desembarcada	1177	1281	+ 8.1

Fuente: Secretaría de pesca (35), Dirección General de Informática, Estadística y Documentación (1988).

La materia prima dirigida a la producción de harinas de pescado se compone principalmente de sardina y anchoveta industriales (23,38). La industrialización de la pesca, tanto para consumo humano directo, fresco, enlatado, congelado, como para el consumo indirecto mediante la elaboración de harinas de pescado, representa un volumen de 755 mil toneladas métricas anuales (Figura 1). Considerando que durante el proceso de enlatado, solo se utiliza el filete, que representa aproximadamente 50% del peso total, que los recursos destinados a la elaboración de harinas de pescado pueden ser utilizados en productos de mayor calidad y valor agregado, y que existe un porcentaje considerable del pescado que se congela o se consume fresco que se desperdicia. Podemos afirmar que existe un volumen de aproximadamente de 140,000 a 150,000 toneladas métricas de proteína de elevada

calidad nutricional que pueden ser transformadas en nuevos productos de un alto valor comercial y nutricional (figura 2).

La demanda de proteínas con un valor nutricional elevado y cuyas propiedades funcionales permitan su uso en una amplia variedad de procesos en la industria alimenticia ha aumentado aceleradamente en los últimos años. Algunas de las proteínas más utilizadas tales como caseína, aislados de soya, albúminas de huevo, etc., han aumentado sus precios en forma considerable (Cuadro 2).

Cuadro 2. Evolución de los precios¹ de diversas proteínas en la industria (\$000/Kg de proteína).

ingrediente	Proteína (%)	03/87	09/87	08/88	Variación en el periodo (%)
Caseinato de sodio	88.0	5.90	9.83	15.00	+173
Leche descremada	34.0	4.86	8.09	14.34	+195
CPP ²	78.0	1.38	2.19	3.52	+155
CPPS ³	84.0	1.76	2.76	4.44	+152
Harina de soya desgrasada	46.0	2.58	3.20	6.25	+142

¹Precios consultados a diversas industrias en el periodo estudiado.

²Concentrado de proteína de pescado.

³Concentrado de proteína de pescado soluble.

En nuestro país existe tradicionalmente un déficit de este tipo de proteínas. Este es más dramático en el caso de las proteínas de la leche, principalmente las caseínas.

La búsqueda de fuentes alternas de proteínas que permitan reemplazar la caseína de la leche en procesos industriales y en la elaboración

de productos como los substitutos de leche para animales lactantes es ampliamente justificada.

Una de las fuentes de proteínas más prometedoras es la proteína del pescado. Diversos procesos (8,15,18,28,32,37), entre ellos el tratamiento con enzimas han sido propuestos para la obtención de productos con propiedades deseables en la industria de alimentos, como solubilidad en agua, capacidad de emulsificación y retención de agua. Los procesos enzimáticos, se llevan a cabo bajo condiciones de reacción (temperatura, pH, etc.), compatibles con la vida de los seres vivos. Por lo tanto, tienen la ventaja de ser reacciones altamente específicas, que se llevan a cabo con rapidez y que, además conservan las características nutricionales de la proteína de pescado.

1.2 El pescado como fuente de proteína.

Diversos estudios han mostrado que el pescado es apto para las necesidades humanas. Su contenido en aminoácidos esenciales está en proporción adecuada a los requerimientos del organismo humano (4,7,11,19,20).

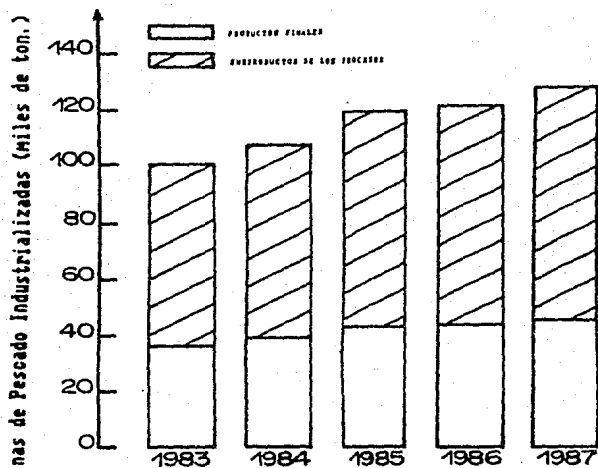


FIGURA 1. INDUSTRIALIZACION DE PROTEINAS DE PESCADO

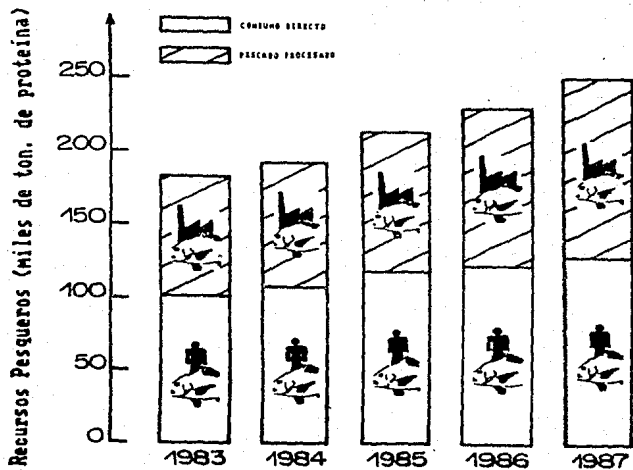


FIGURA 2. CONSUMO DIRECTO E INDUSTRIALIZACION DE LOS RECURSOS PESQUEROS.

Cuadro 3. Contenido de aminoácidos esenciales en algunas proteínas comparadas con el patrón de requerimientos sugerido por la FAO (mg de aminoácidos por gramo de proteína).

Aminoácidos	Patrón de la FAO (1973)			Trigo	Maíz	Arroz	Leche descre. en polvo	Huevo	N.P.P. (4)
	Infantes (1) (0-6 meses)	Niños (2) (10-12 años)	Adultos (3)						
Histidina	14	0	0	23	26	22	35	22	29
Isoleucina	35	37	18	34	38	45	59	54	45
Leucina	80	56	25	68	106	80	107	86	75
Lisina	52	15	22	26	27	35	78	70	80
Metionina + Cisteína	29	34	24	36	47	34	32	57	41
Fenilalanina + Tirosina	63	34	25	75	87	103	109	93	74
Treonina	44	44	13	30	40	32	52	47	43
Triptófano	8.5	4.6	6.5	11	7	6	15	17	12
Valina	47	41	18	46	50	54	64	66	52

(1) Basado en un nivel de seguridad de ingestión de 2 g de proteína/Kg de peso vivo/día.

(2) Basado en un nivel de seguridad de ingestión de 0.8 g de proteína/Kg de peso vivo/día.

(3) Basado en un nivel de seguridad de ingestión de 0.55 g de proteína/Kg de peso vivo/día.

(4) Hidrolizado de proteína de pescado comercial, Sopropeste, Canadá.

Una aplicación interesante para las proteínas de pescado es su utilización para reemplazar las proteínas de la leche en substitutos de leche para animales lactantes. Actualmente estos productos son formulados a partir de leche descremada deshidratada y grasas animales y/o vegetales emulsificadas. El elevado costo de las proteínas de la leche hacen necesario desde el punto de vista económico su reemplazo por fuentes alternas de proteínas, como las del pescado, en la formulación de substitutos de leche para becerros

en crecimiento.

Sin embargo las características necesarias para que una fuente alterna de proteína pueda ser utilizada para reemplazar las proteínas lácteas son las siguientes:

1. El producto debe ser soluble o debe formar una dispersión estable en agua a 37°C.
2. El producto debe ser aceptable para el ternero recién nacido.
3. La digestibilidad aparente del producto debe ser similar a la de las proteínas de la leche, que es elevada (90-95%).
4. El aporte de aminoácidos esenciales debe ser adecuado a las necesidades del becerro en crecimiento.
5. La proteína de reemplazo no debe tener efectos adversos sobre el crecimiento, la conversión alimenticia y la calidad de la carne.
6. La proteína propuesta debe encontrarse en forma concentrada.

Los métodos más generalizados de procesamiento de pescado a escala industrial conducen a la obtención de productos como:

Las harinas, los concentrados y los aislados (preparaciones parcialmente purificadas) de proteína de pescado y más recientemente, los hidrolizados enzimáticos de estas proteínas.

1.3 Harinas de pescado.

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. Otras desventajas de los productos obtenidos por este método son los problemas de rancidez debida a la oxidación acelerada de las grasas del pescado si no se usan antioxidantes adecuados, y la falta de solubilidad y su capacidad de emulsificación. Finalmente, a pesar de contener entre 50 y 60% de proteína cruda, el proceso de secado directo a que se somete el pescado, reduce marcadamente la digestibilidad de la proteína y su valor nutricional. Por estas razones las harinas del pescado son utilizadas casi únicamente como complemento proteico en alimentos para ganado (9,10,23,43)

1.4 Concentrados de proteína de pescado.

Una mejor forma de canalizar los recursos pesqueros nacionales sería la fabricación de concentrados de proteína de pescado (CPP).

El Grupo de Consejeros en Proteínas de las Naciones Unidas define un concentrado de proteína de pescado como sigue:

Un concentrado de proteína de pescado es un producto estable para consumo humano, preparado a partir de pescado entero, de otros animales acuáticos o partes 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 un olor y sabor que dependen del proceso utilizado.

Los productos así obtenidos tienen un elevado contenido proteico, generalmente entre 75 y 85%, y un bajo contenido de lípidos, usualmente menor del 1%, tienen poco olor y sabor, pero carecen de propiedades funcionales como solubilidad en agua y capacidad de emulsificación. El costo del proceso para la obtención de los concentrados de proteína de pescado 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. Por estas razones los concentrados de proteína de pescado solo se emplean como enriquecedores proteicos para alimentos en los que la solubilidad en agua y otras propiedades funcionales no son necesarias (12,26).

1.5 Aislados de proteína de pescado.

Productos similares en composición química a los concentrados de proteína de pescado son los aislados de proteína de pescado (A.P.P.). 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 C.P.P. los A.P.P. son poco solubles en agua (40,41). Los procesos requeridos para la elaboración tanto de concentrados como de aislados requieren inversiones muy costosas en infraestructura; la extracción del aceite con solventes y la recuperación de estos por

destilación, es una de las partes más caras del proceso. Ha sido reportado (26) que los residuos de algunos solventes utilizados en los procesos de extracción como el dicloroetano (DCE) son tóxicos para diversas especies animales, como los becerros.

1.6 Hidrolizados de proteína de pescado (HPP).

Hemos mostrado como la carencia de propiedades funcionales en las harinas, los concentrados y los aislados de proteína de pescado, es uno de los factores que limitan su uso en diversas aplicaciones en la industria de alimentos. Una alternativa prometedora para obtener concentrados de proteína de pescado con propiedades funcionales, particularmente solubilidad y retención de agua, es la modificación enzimática de las proteínas, mediante el uso de enzimas proteolíticas comerciales (16,17,44). Los productos así obtenidos se denominan hidrolizados de proteína de pescado (HPP).

Las primeras preparaciones de pescado hidrolizado 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 (23). Posteriormente, se usaron ácidos minerales tales como el clorhídrico o el sulfúrico con los que se acidificaba el pescado para obtener productos como los ensilados en donde debido a la acidez del producto el periodo de conservación es prolongado (31). Estos primeros procesos tenían como objetivo principal la conservación del pescado pero los productos obtenidos no son productos con un contenido elevado de proteínas y su manejo es difícil.

Los hidrolizados de proteína de pescado son productos con alto contenido proteico (80-90%), solubles en agua, y con una elevada capacidad de emulsificación (36-38.6 ml de aceite/100 mg de HPP). Son obtenidos mediante procesos de hidrólisis enzimática bajo condiciones controladas de pH, temperatura, tiempo, concentración de enzima y sustrato. La fracción insoluble se separa por filtración y la proteína soluble presente en el sobrenadante después de separar la fracción lipídica por centrifugación o decantación, se recupera secando por atomización. Diversos estudios (7,22,33) indican que el valor nutricional y la digestibilidad de este producto son elevadas. Su empleo en substitutos de leche para animales lactantes ha dado mejores resultados que los concentrados de proteína de pescado y que los productos elaborados con soya (7,18).

El incremento en la producción de proteasas comerciales en los últimos 25 años, ha permitido el desarrollo de procesos industriales basados en el uso de proteasas bacterianas obtenidas por vía fermentativa para la producción de hidrolizados de proteína de pescado (HPP). La disminución en los precios de las enzimas y el no requerir procesos de extracción de lípidos mediante el uso de solventes son factores que favorecen la rentabilidad de estos procesos.

1.7 Enzimas proteolíticas industriales.

Más del 80% de todas las enzimas industriales, son hidrolíticas y

por lo tanto son empleadas para la depolimerización de sustratos naturales. Del conjunto de enzimas hidrolíticas, 59% son enzimas proteolíticas (16). El mercado de enzimas industriales se estima en alrededor de 75000 toneladas de producto, con un costo de 600 millones de dólares en 1985. Las enzimas proteolíticas tienen por lo tanto un mercado cuyo valor estimado es de aproximadamente 350 millones de dólares. Las carbohidrasas y las lipasas completan el mercado de las enzimas industriales (figura 3).

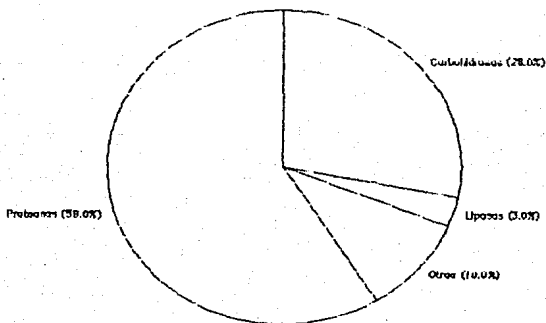


Figura 3. Distribución de las hidrolasas industriales.

1.7.1 Propiedades de las enzimas.

Existen en el mercado una amplia variedad de proteasas industriales, de origen animal, vegetal y microbiano. La selección de la enzima adecuada, en un proceso de hidrólisis enzimática de proteína de pescado es una decisión importante para obtener un producto competitivo con las características deseadas. Los factores que deben considerarse son:

1.7.1.1 Tipo de enzima.

La enzima seleccionada debe ser capaz de actuar sobre el sustrato propuesto, en este caso la proteína de pescado, permitiendo la obtención de péptidos de tamaño suficientemente pequeño para mantenerse en solución, pero sin llegar a producir péptidos o aminoácidos libres que den un sabor amargo al producto.

1.7.1.2 pH.

La enzima debe tener su actividad máxima a un pH cercano a la neutralidad. En la práctica un intervalo de entre 5.0 y 9.5 es aceptable. Valores mayores o menores de pH podrían producir daños a la proteína. Dentro del intervalo propuesto la decisión depende del costo de acidificar o alcalinizar el medio y de las ventajas asociadas.

1.7.1.3 Temperatura.

La enzima debe tener una temperatura óptima suficientemente elevada para evitar la contaminación bacteriana durante el proceso. Temperaturas de entre 50 y 60°C parecen ser las más apropiadas en procesos de hidrólisis de la proteína de pescado.

1.7.1.4 Activadores e inhibidores.

La velocidad con que actúan algunas proteasas sobre su sustrato depende de la presencia de activadores e inhibidores, esto debe tenerse en cuenta para el establecimiento del proceso, ya que puede generar costos

adicionales, por concepto de compra, tratamiento y en caso necesario, eliminación de los inhibidores de la mezcla de reacción.

1.7.1.5 Disponibilidad.

En un proceso industrial que abastece un mercado en forma continua, es necesario considerar al seleccionar la enzima que esté disponible en el mercado durante todo el año y que su actividad, calidad y precio sean estables.

1.7.1.6 Apoyo técnico.

Frecuentemente hay mejoras en las enzimas industriales, por lo que al momento de seleccionar una enzima, se debe contar con información actualizada.

1.7.1.7 Costo.

El costo es determinante en la elección de una enzima para el éxito de un proceso industrial. El costo por unidad de actividad debe permitir la obtención de un producto, en este caso un HPP a precios competitivos.

1.8 Propiedades de la enzima seleccionada.

La enzima seleccionada para un proceso de hidrólisis parcial de la proteína del pescado debe producir una hidrólisis rápida y transformar la proteína en péptidos suficientemente pequeños para estar en solución pero, sin que se liberen aminoácidos hidrófobos que

den sabores amargos. El uso de proteasas para obtener hidrolizados de proteína de pescado presenta diversas ventajas:

- La hidrólisis solubiliza la proteína.
- Permite una separación más eficiente de la grasa.
- Permite la concentración más eficiente de la proteína.
- El secado por aspersión conserva el valor nutricional.
- El producto final tiene un valor de mercado 3 veces más elevado que las harinas de pescado.
- Puede usarse en diversos productos alimenticios como:
 - Sustitutos de leche
 - Sopas.

1.9 Uso de las enzimas proteolíticas comerciales.

La aparición en el mercado de una amplia variedad de proteasas comerciales en los últimos 25 años, ha permitido su uso en el desarrollo de nuevos procesos industriales que en términos económicos compiten con los procesos tradicionales. La producción industrial de hidrolizados de proteína de pescado es un ejemplo de estos nuevos procesos (27).

1.10 Materias primas para el proceso de hidrólisis.

Las especies como la sardina industrial y la anchoveta son utilizadas en la preparación de harinas de pescado, concentrados de

proteína de pescado, aislados de proteína de pescado y ensilados de proteína de pescado (debe mencionarse que en México solamente se producen harinas de pescado a nivel industrial, y ensilados a escala artesanal). Una alternativa prometedora para el procesamiento de pescado es la hidrólisis enzimática de la proteína. Estos productos tienen posibilidades de empleo en la industria alimentaria y de su incorporación en la dieta de la población mexicana.

En la elaboración de estos productos pueden emplearse la sardina y la anchoveta. Adicionalmente puede utilizarse la fauna de acompañamiento del camarón, que está formada por especies pequeñas, no comercializables, y subproductos de la industria de enlatado de atún, en las que más de 50% del peso procesado se desperdicia (23).

1.11 Usos de los Hidrolizados de Proteína de Pescado (HPP) en alimentos.

Los requerimientos en aminoácidos esenciales de los animales y del hombre son conocidos y han sido ampliamente reportados.

En el caso del hombre la proporción recomendada de aminoácidos ha sido publicada por la F.A.O., en base a estos datos, algunas proteínas como las de huevo, leche y carne se consideran de muy alto valor nutricional (Cuadro 2 pag 4). Los HPP proporcionan una dosis equilibrada de aminoácidos esenciales que cubren los requerimientos del hombre y de diversas especies animales como los terneros y los lechones. Es deseable, que por la alta calidad de su proteína, los HPP se empleen con mayor frecuencia en la elaboración de productos alimenticios, tanto para el hombre como para los animales.

1.12 Usos potenciales (aplicaciones) de los HPP.

1.12.1 Substitutos de leche para becerros.

Se han empleado hidrolizados de proteína de pescado para reemplazar parcial y totalmente la proteína de la leche en la alimentación de becerros y corderos de 3 días de nacidos, los resultados muestran que con el HPP se obtienen ganancias de peso, digestibilidades de materia seca, nitrógeno y grasa similares a los obtenidos con caseína como única fuente de proteína (21,22,33).

1.12.2. Proteínas alternativas para procesos industriales.

Una aplicación potencial de los HPP en la industria alimentaria es en el reemplazo de proteínas como las caseínas, las proteínas de huevo, las peptonas y los concentrados de proteína de soya, cuyo precio es alto. Estas aplicaciones comprenden una amplia gama de productos como sopas, pastas, medios de fermentación para producción de enzimas proteolíticas y antibióticos.

1.13 Empleo futuro de los HPP.

Debido a que los HPP son solubles en agua y tienen un contenido balanceado de aminoácidos esenciales, pueden emplearse en el tratamiento de pacientes con deficiencias nutricionales, o en la alimentación de personas que estén siendo sometidas a tratamientos médicos y que tengan dificultades para deglutir alimentos en estado sólido.

Justificación.

El desarrollo de un proceso de fabricación de un concentrado de proteína de pescado soluble mediante el uso de proteasas comerciales permitiría obtener productos de un elevado valor nutricional, con características funcionales y organolépticas deseables a partir de recursos protéicos marinos actualmente subutilizados.

1.15 Hipótesis.

Se puede desarrollar un método para obtener el hidrolizado con una pérdida mínima en el valor nutricional.

1.16 Objetivos.

1. Determinar a escala de laboratorio las condiciones óptimas de tiempo y concentración de enzima requeridas para obtener una hidrólisis máxima de la proteína de lisa (Mugil cephalus) con una proteasa neutra de Bacillus subtilis utilizando como criterio de medición el porcentaje de nitrógeno soluble.
2. Escalar el proceso de hidrólisis de proteína de pescado a nivel bench (20 kgs de materia prima) y determinar las condiciones del proceso para la obtención de un HPP con un contenido máximo de proteína y un contenido mínimo de grasa.
3. Determinar en pruebas in vivo la calidad de la proteína del hidrolizado obtenido en la planta piloto, utilizando como criterios de calidad, el valor nutricional, el PER, la ganancia de peso, la ingestión de alimento, la conversión alimenticia y la digestibilidad aparente del nitrógeno.
4. Determinar la respuesta nutricional a la suplementación con L-Lisina de síntesis.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

2.1 Materias primas:2.1.1 Pescado.

Las especies de pescado adecuadas para este tipo de proceso son la sardina y la anchoveta industriales. Dada la dificultad para proveerse de anchoveta o sardina, para los fines de este estudio se seleccionó una especie diferente cuya composición es similar a la de esas especies. La especie con que se llevará a cabo este estudio es Mugil cephalus, denominada popularmente "Lisa".

El pescado fresco fué eviscerado, lavado al chorro de agua, molido 2 veces consecutivas por un molino manual (Arromex P208 LKJ) y lavado nuevamente al chorro de agua sobre un tamiz # 40. Se tomaron muestras representativas y el lote de pescado así preparado fué mantenido en congelación hasta el momento de su uso.

2.1.2 Enzimas proteolíticas.

Se obtuvieron para su estudio 6 proteasas comerciales disponibles en el mercado de la ciudad de México.

Se establecieron los siguientes criterios para la selección de la enzima utilizada en el proceso de hidrólisis de proteínas de pescado: la actividad, el costo por unidad de enzima, las condiciones de inactivación de la enzima, el pH y la temperatura óptima de actividad. El cuadro 4 muestra la comparación de las enzimas en términos de estos criterios.

Cuadro 4. Información de diversas proteasas comerciales.

Nombre comercial	Origen	Tipo	Fabricante
HT-Proteolytic-200	<u>B. Subtilis</u>	Neutra	ENHIX
Brev-N-zyme	<u>B. Subtilis</u>	Neutra	ENHIX
Panzima G	<u>A. Orizae</u>	Neutra	ENHIX
Tendrin	<u>A. Orizae</u>	Neutra	ENHIX
Maxatase	<u>B. Subtilis</u>	Alcalina	GIST BROCADES
Takabate 360	<u>B. Subtilis</u>	Alcalina	ENHIX

2.1.2.1 Actividad.

La actividad proteolítica de las enzimas se determinó sobre un sustrato de caseína al 2% (Merck cat. 2244, Merck S.A. de C.V., México, D.F.) de acuerdo a la siguiente metodología:

Preparación de soluciones:**1. Solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M pH 7.0**

Solución A. Se pesan 27.218 g de KH_2PO_4 , y se aforan a 1000 ml con agua destilada.

Solución B. Se pesan 34.836 g de K_2HPO_4 , y se aforan a 1000 ml con agua destilada.

Se ajusta el pH de la solución B a 7.0 añadiendo solución A.

2. Solución amortiguadora de carbonatos 0.2 M pH 9.5

Solución A. Se pesan 21.2 g de Na_2CO_3 y se aforan a 1000 ml con agua destilada.

Solución B. Se pesan 16.8 g de NaHCO_3 y se aforan a 1000 ml con agua destilada.

Se ajusta el pH de la solución A a 9.5 añadiendo solución B.

3. Caseína al 2% en solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M pH 7.0

2.0 g de caseína (Merck cat. 2244, Merck S.A. de C.V., México, D.F.) se disuelven en 100 ml de solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M.

4. Caseína al 2% en solución amortiguadora de carbonatos 0.2M.

2.0 g de caseína (Merck cat. 2244, Merck S.A. de C.V., México, D.F.) se disuelven en 100 ml de solución amortiguadora de carbonatos 0.2 M pH 9.5.

5. Solución de ácido tricloroacético (TCA) al 5%.**6. Soluciones para la determinación de Lowry:**

Carbonato de sodio al 2% en solución 0.1N de hidróxido de sodio.

Tartrato de sodio y potasio al 1% en agua destilada.

Sulfato de cobre al 1% en agua destilada.

Reactivo de Folin en agua destilada 1:1.

7. Solución de enzima al 1% en amortiguador fosfatos 0.2M, pH 7.0, y en amortiguador carbonatos 0.2M, pH 9.5

Para cada una de las enzimas, se pesa 0.1 g y se disuelve en 10 mL de la solución amortiguadora de fosfatos para las enzimas neutras o en 10 mL de la solución amortiguadora de carbonatos para las enzimas alcalinas.

Procedimiento:

Colocar en un tubo de ensaye 2.0 mL de solución de caseína al 2% en solución amortiguadora de fosfatos 0.2M, pH 7.0 para las proteasas neutras; o de carbonatos 0.2M, pH 9.5 para las proteasas alcalinas, calentar a 55°C, añadir 1 mL de la solución de enzima al 1% en la misma solución amortiguadora, incubar a 55°C durante 35 minutos, detener la reacción adicionando 4 mL de solución de TCA al 5% y determinar la proteína soluble en el filtrado, después de pasar la solución por papel filtro Whatman # 1. La proteína en el filtrado se determina por el método de Lowry (25).

Se prepara un blanco sin enzima añadiendo 1 ml de solución amortiguadora en lugar del ml de enzima; y un tiempo cero en el que la reacción se detiene inmediatamente después de añadir la enzima por la adición de 4 mL de solución de TCA.

2.1.2.2 Curvas de inactivación.

Para la enzima seleccionada se determinaron las actividades proteolíticas residuales después de incubar a diferentes temperaturas y tiempos en la siguiente forma:

Se prepararon soluciones de enzima y de caseína en la misma forma que para determinar la actividad enzimática. Se añadió a un tubo de ensaye 10 ml. de la solución de enzima, y se sumergió en un baño de agua en cualquiera de las combinaciones de temperatura y tiempo correspondientes. El procedimiento se repitió por duplicado para cada una de las 9 combinaciones de temperaturas: 70, 80 y 90°C y de tiempos de preincubación 5, 10 y 15 min. establecidos; de acuerdo al siguiente diseño experimental.

Cuadro 5. Diseño experimental utilizado para estudiar el efecto del tiempo y la temperatura de preincubación sobre la actividad residual de HT-Proteolytic-200.

		Temperatura (°C)		
		70	80	90
T I E M P O (Min)	5			
	10			
	15			

Los tubos conteniendo la solución de la enzima preincubada se enfrían en baño de hielo durante 10 min, se toman alícuotas

de un mL que se añaden a los tubos conteniendo 2 mL de la solución de caseína. Se colocan en baño maría a 55°C durante 35 min, y al final de esta incubación la reacción se detiene por la adición de 4 mL de solución de ácido tricloroacético al 5%. El tubo se enfría en baño de hielo, el contenido se filtra a través de un papel filtro Whatman # 1 y se determina la proteína soluble en el filtrado por el método de Lowry.

2.1.2.3 Temperatura y pH óptimos.

Se trabajó con la enzima seleccionada bajo las condiciones óptimas de temperatura y pH reportadas por los fabricantes.

2.1.2.4 Determinación de la concentración de enzima y del tiempo de hidrólisis óptimos.

Para determinar la concentración óptima de la enzima, se estudiaron tres concentraciones: 0.0, 0.5 y 1.0% (p/p) con respecto a la proteína del pescado, y 3 tiempos de hidrólisis: 0, 1 y 3h. La cantidad de enzima adicionada se calculó en base al contenido de proteína del pescado previamente eviscerado, molido y lavado.

La reacción de hidrólisis se llevó a cabo en una solución amortiguadora de fosfatos 0.2M de pH 7.5. La hidrólisis se efectuó en matraces Erlenmeyer de 500 mL de capacidad, usando

50 g de pescado previamente descongelado y 100 mL de solución amortiguadora, después de mezclar se añadió 1 mL de la solución de enzima a la concentración correspondiente. La temperatura de incubación y la velocidad de agitación fueron controladas a 55°C. y 150 rpm respectivamente en un baño (RECIPROCATING WATER BATH SHAKER Mod. RW-650). Al final del periodo de hidrólisis, las muestras fueron colocadas en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos para inactivar la enzima, enfriadas a temperatura ambiente y centrifugadas a 10,000 X G durante 10 min a 10°C en una Centrifuga Sorvall RC5. Del sobrenadante obtenido se tomó una alícuota de 1 mL, se digirió en un matraz microkjeldahl, se diluyó con agua en proporción 1:2500, se determinó el contenido de NH₃ por el método de indofenol (42) y se calculó el contenido de proteína.

Para cada combinación de tiempo y concentración de enzima ensayados se empleó un matraz preparado en la forma descrita anteriormente, de tal modo que se obtuvieron 9 combinaciones diferentes.

El diseño empleado fué:

Cuadro 6. Diseño experimental para determinar la actividad proteolítica de HT-Proteolytic-200.

		Concentración (%)		
		0.0	0.5	1.0
T I E M P O (h)	0			
	1			
	3			

Cada tratamiento se llevó a cabo por triplicado. Los tratamientos fueron las combinaciones de los dos factores estudiados. La secuencia en que éstas fueron realizadas fué aleatoria.

2.2 Análisis.

En muestras representativas del pescado preparado en la forma descrita para la reacción de hidrólisis, se determinó:

2.2.1 **Protelna cruda.** De acuerdo al método de Kjeldahl (2).

2.2.2 **Materia seca.** En crisoles previamente puestos a peso constante se pesó entre 1.0 y 1.5 g de muestra, los crisoles se colocaron en una estufa de convección forzada (Felisa mod. FE19) a 80°C. hasta peso constante, la materia seca se calculó por la diferencia de peso antes y después del secado.

2.2.3 **Grasa (Extracto etéreo).** Se determinó por el método de Soxhlet (2).

2.2.4 **Cenizas.** Se determinaron colocando una muestra de 1.0 a 1.5 g en crisoles previamente incinerados y calcinados a peso constante, se incineraron hasta el cese del desprendimiento de vapores, se colocaron en una mufla (SYBRON Thermoline 1500) a 550°C durante 4 horas. Las cenizas se calcularon por la

diferencia de peso antes y después de la calcinación, referido al peso de la muestra.

2.2.5 Determinación de la proteína soluble.

Para los fines de los experimentos de hidrólisis de proteína de pescado, se establecieron las condiciones siguientes:

2.2.5.1 A nivel laboratorio.

Después de hidrolizar la proteína, inactivar la enzima y centrifugar a 10000 X G (Sorvall RC-5) durante 10 min a 10°C, se determinó el contenido de proteína en el sobrenadante en la forma descrita para los experimentos de hidrólisis. Se consideró proteína soluble, la fracción de proteína que se recuperó en el sobrenadante, con respecto al contenido inicial de la proteína en el medio de reacción.

Ejemplo:

Se pesaron 50 g de pescado con un contenido de 15% de proteína, se añadieron 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M, se ajustó la temperatura a 55°C, se adicionaron 75 mg de enzima (0.5 % con respecto a 7.5 g de proteína en el medio de reacción) disuelta en 1 ml de solución amortiguadora. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 3 horas. Se centrifugó el medio de reacción de acuerdo a las condiciones descritas. Se tomó una alícuota del sobrenadante, se digirió (microjelinal), y se le determinó el contenido de proteína de acuerdo al método descrito (42), el

porcentaje de proteína solubilizado en cada muestra se obtiene dividiendo los gramos de proteína recuperada en el sobrenadante entre los gramos de proteína total del medio de reacción.

2.2.5.2 A nivel planta piloto:

Se consideró proteína soluble, la fracción de proteína recuperada del sobrenadante del medio de reacción después de hidrolizar la proteína, inactivar la enzima a 85°C durante 10 min. y filtrar la solución sobre un filtro de 150 micras de poro.

2.2.6 Determinación de la proteína por el método de indofenol.

Reactivos:

Solución "A"

Se disuelven 10 g de fenol y 50 mg de nitroprusiato de sodio en 1 L. de agua destilada.

Solución "B"

Se disuelven 5.0 g de hidróxido de sodio y 9.0 ml de solución de hipoclorito de sodio al 4 % en 1 L. de agua destilada.

2.2.6.1 Procedimiento:

Se toma una alícuota de 1 mL del sobrenadante a escala

laboratorio ó del filtrado a nivel de planta piloto y se digiere en la forma descrita para el método de microkjeldahl. La solución obtenida se afora a 100 mL de la cual se toma una alícuota de 10 mL, se ajusta el pH entre 2.5 y 3.5 con una solución de hidróxido de sodio 1 N. La solución obtenida se afora nuevamente a 100 mL. De esta solución se toma una alícuota de 0.1 a 1.0 mL, a la cual se le añade agua destilada hasta completar 1.0 mL, y se le adicionan 5 mL de la solución "A" y 5 mL de la solución "B". Se mezclan perfectamente las soluciones y se dejan reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se determina la absorbancia de la solución a 625 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 20, Baush & Lomb), usando como blanco una solución preparada en la misma forma, pero en la que se omite la adición de muestra. La concentración del amonio de la muestra se determina interpolando su absorbancia en una curva estándar de sulfato de amonio preparada de la siguiente forma:

2.2.7 Curva estándar de sulfato de amonio.

Se pesan 386,3 mg de sulfato de amonio, se aforan a 1 L.; a esta solución se le denomina solución "stock". Se toman 10 mL de esta solución y se aforan a 100 mL, a esta solución se le denomina solución de trabajo y contiene 10 microgramos de NH_3/mL . La curva se preparó colocando en tubos de ensaye alícuotas de 0.1 a 0.6 mL con incrementos de 0.1 mL de la

solución de trabajo y adicionando agua suficiente para hacer 1 ml. Se adicionó a cada tubo 5 mL de solución "A" y 5 mL de solución "B", se dejó reposar 30 minutos y se determinó su absorbancia a 625 nm.

2.3 Producción de HPP a nivel planta piloto.

2.3.1 Experimento 1:

En este experimento preliminar, se mollió, evisceró y lavó al chorro de agua un lote de 1.5 Kg de pescado (Mugil cephalus), se tomaron muestras en las que se determinó el contenido de proteína, grasa, humedad y cenizas y el lote de pescado preparado se conservó en congelación hasta su uso. Para la reacción de hidrólisis se empleó una relación agua:substrato de 1:1. Se llevó a cabo el experimento de hidrólisis en un fermentador de 14 L (New Brunswick Mod. 00-82-14 H 1094-0002) con 1.5 Kg de pescado y 1.5 L de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5. El medio de reacción se mantuvo a 55°C, con una agitación de 300 rpm, durante un periodo de 3 horas. Al final del periodo la solución obtenida se pasó por un filtro de 150 micras de poro para separar la fracción insoluble (espinas y escamas), el filtrado se calentó a 85°C durante 10 minutos y se enfrió en baño de agua. La solución se dejó reposar a 4°C durante 72 horas, al final de este periodo, se separó la fracción lipídica por diferencia de densidades. A la proteína contenida en la solución se le consideró proteína soluble.

2.3.2 Experimento 2:

Se prepararon 15 Kg de pescado fresco en la forma descrita en el experimento 1. Se determinó su contenido de proteína, grasa, humedad y cenizas y se conservó en congelación hasta su uso. El lote de pescado preparado se dividió en 2 porciones de 6 Kg cada una.

Se llevaron a cabo 2 hidrólisis. En cada una de ellas se añadieron 6 Kg de pescado y 6 L de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5 en un fermentador de 14 L (New Brunswick Mod. 00-82-14 H 1094-0002). Se elevó la temperatura a 55°C y se adicionó la enzima disuelta en 50 mL de la solución amortiguadora, para dar una concentración de 0.5 % con respecto a la proteína del sustrato. La mezcla se agitó a 300 rpm durante 3 horas. Al final del período de hidrólisis, se filtró la mezcla por filtros de tamaño de poro decreciente, hasta llegar a 150 micras. El filtrado se calentó a 85°C durante 10 min.

La solución obtenida se colocó en recipientes de nalgene de 20 L de capacidad. Se le adicionó 1 g de propionato de sodio y 1 g de metil parabeno para evitar la contaminación bacteriana y se conservó en refrigeración durante 48 h con objeto de separar la grasa por decantación.

Al final del período de decantación se separó la solución de proteína de la capa de grasa por diferencia de densidades, se elevó la temperatura de la solución a 50°C con vapor y se deshidrató la solución por aspersión en un secador (Niro Atomizer modelo Pilot minor tipo FUHT BAA 06 Copenhage, Dinamarca). Se

emplearon como condiciones de secado una temperatura de entrada de 205°C y una temperatura de salida de 95°C, la velocidad de flujo fué de 8 L/h.

El producto obtenido fué pesado y mantenido en refrigeración hasta el momento de su uso. Se tomaron dos muestras representativas que se analizaron para determinar proteína cruda, lípidos, cenizas y humedad.

Se determinó igualmente la cuenta total de microorganismos, la presencia de coliformes, de hongos y levaduras por los métodos descritos a continuación:

2.4 Análisis microbiológicos (2,13):

a) Los medios de cultivo utilizados en la caracterización microbiológica del hidrolizado de proteína de pescado fueron:

1. Agar nutritivo para bacterias:

Peptona Difco.	2 %
Extracto de levadura - Difco.	1 %
Glucosa.	2 %
Agar.	2 %
pH	7.0

2. Agar nutritivo para hongos:

Peptona	2 %
Extracto de levadura	1 %
Glucosa	2 %
Agar	2 %
pH	5.0

3. Agar MacConkey Difco para determinación de coliformes.

10 g de medio se aforan a 1 l. con agua destilada.

4. Agar-papa-dextosa Merck Cat. 10130 para determinación de levaduras.

10 g de medio se disuelven en 500 ml. de agua destilada, se ajusta el pH a 3.5 con ácido tartárico al 10% y se afora a 1 l. con agua destilada.

5. Agar estreptocócico KF - Bioxon Cat. 220-1 para determinación de estreptococos.

10 g de medio se aforan a 1 l. con agua destilada.

Nota: Los medios usados en la determinación microbiológica fueron disueltos con ayuda de agitación y calor y esterilizados durante 15 minutos a 121°C. Posteriormente enfriados a 40°C y se colocaron 10 ml. en cajas petri estériles.

b) Procedimiento.

Se pesa 1 g de HPP y se suspende en 99 ml de peptona al 0.1%. Se incuba a temperatura ambiente durante una hora con agitación esporádica (Dil 10^{-1}). Se hacen diluciones seriadas hasta 10^{-9} en peptona al 0.1% y se siembra por plato 0.1 ml de cada dilución en los diferentes medios. Se incuban las cajas a 37°C (excepto las de agar nutritivo para hongos que se incuban a 29°C) durante 48 h en el caso de bacterias y durante 72-96 horas en el caso de levaduras y hongos. Se cuenta el número de colonias en las cajas donde aparezcan entre 40 y 200 colonias.

2.5 Determinación del valor nutricional del HPP obtenido en el laboratorio piloto.**2.5.1 Animales:**

24 ratas Wistar, machos de entre 21 y 24 días de edad en el experimento 1 y 18 en el experimento 2, fueron distribuidas aleatoriamente entre las dietas experimentales (cuadros 7 y 8). Los animales fueron alojados en jaulas metabólicas individuales, en una habitación mantenida a una temperatura de 23± 1°C y una humedad de 55± 5%. Se ofreció a los animales agua ad libitum, el período de luz y oscuridad fué de 12 horas cada uno. El experimento tuvo una duración de 28 días, los animales fueron pesados dos veces en días consecutivos al inicio y al final del

experimento y al inicio de cada semana; se ofrecieron las dietas experimentales a libre acceso. las cantidades de alimento ingeridas por cada rata fueron medidas cada dos días. Durante la segunda semana del experimento se recolectaron las heces de cada rata, se pesaron y se determinó el contenido de materia seca y de proteína cruda (5,6).

2.5.2 Dietas:

Para los experimentos 1 y 2 se elaboraron dietas isoproteicas e isoenergéticas. En el experimento 1 las dietas fueron ajustadas a entre 8 y 9 % de proteína y 4000 cal/Kg (Cuadro 7). En el experimento 2, las dietas fueron ajustadas a entre 10.5 y 11% de proteína y 4000 cal/Kg (Cuadro 8).

Cuadro 7. Formulación y composición química de las dietas durante el experimento 1.

Ingrediente	CASEINA	HPP-1	HPP-2	O-PROT
Caseína ¹	11.0	----	----	----
HPP-1 ²	----	12.0	----	----
HPP-2 ³	----	----	13.8	----
Aceite de maíz ⁴	8.0	8.0	6.1	8.0
Almidón de maíz ⁵	72.6	71.3	75.1	86.3
Mezcla de vitaminas ⁶	1.0	1.0	1.0	1.0
Mezcla de minerales ⁷	4.0	4.0	4.0	4.0
Celulosa ⁸	3.4	3.7	----	0.7
Análisis químico				
Proteína (N X 6.25)	8.8	8.9	8.1	0.0
Materia seca	92.4	92.2	93.1	92.6
Energía bruta (cal/g) ⁹	4.0	4.0	4.0	4.0

¹Caseína. Teklad High Protein, 160030, Madison Wi, U.S.A.²Hidrolizado de proteína de pescado comercial, Hamilton, Canada.³Hidrolizado de proteína de pescado elaborado en la planta piloto del I.I.B.M.⁴Aceite de maíz comercial, Mazola.⁵Almidón de maíz comercial Maizena.⁶Mezcla de vitaminas. Teklad No. 40060, Madison Wi, U.S.A.⁷Mezcla de minerales. Teklad test diets, Madison Wi, U.S.A.⁸Celulosa. Non Nutritive Cellulose, Teklad, Madison Wi, U.S.A.⁹Energía bruta calculada según los valores reportados por Allen, Feedstuffs (1).

Cuadro 8. Dietas preparadas para medir el efecto de suplementación de L-Lisina sobre el H.P.P. producido en la planta piloto del I.I.B.M.

Ingrediente	Dieta sin Lisina	Dieta 0.2% Lisina	Dieta 0.4% Lisina
H.P.P. Experimental ¹	13.8	13.8	13.8
L-Lisina ²	----	0.2	0.4
Aceite de maíz ³	8.0	8.0	6.1
Almidón de maíz ⁴	69.8	69.3	72.7
Mezcla de vitaminas ⁵	1.0	1.0	1.0
Mezcla de minerales ⁶	4.0	4.0	4.0
Celulosa ⁷	3.4	3.7	2.0
Análisis químico			
Proteína (N X 6.25)	10.8	10.9	10.8
Materia seca	92.4	92.6	92.3
Energía bruta (cal/g) ⁸	4.0	4.0	4.0

¹Hidrolizado de proteína de pescado elaborado en la planta piloto del I.I.B.M.

²L-Lisina de síntesis. Teklad Madison Wl. U.S.A.

³Aceite de maíz comercial Mazola.

⁴Almidón de maíz comercial Maizena.

⁵Mezcla de vitaminas. Teklad No. 40060. Madison Wl. U.S.A.

⁶Mezcla de minerales. Teklad test diets. Madison Wl. U.S.A.

⁷Celulosa. Non Nutritive Cellulose. Teklad. Madison Wl. U.S.A.

⁸Energía bruta calculada según los valores reportados por Allen Feedstuffs (11)

Se formuló una dieta sin proteína para la determinación del NPR.

Se determinó a las dietas el contenido de proteína.

Se calcularon en base a los resultados obtenidos los siguientes

2.5.3 Parámetros nutricionales:

2.5.3.1 Ganancia de peso (GP): Diferencia de peso entre las medias de los dos pesos finales menos la media de los dos pesos iniciales (al inicio y al final del experimento, los animales se pesaron en días consecutivos).

2.5.3.2 Tasa de conversión alimenticia (TCA): Es la cantidad de alimento en gramos que son necesarios para ganar un gramo de peso vivo. Se calculó con la fórmula:

$$TCA = \text{Alimento ingerido(g)} / \text{Ganancia de peso(g)}$$

2.5.3.3 Coefficiente de eficacia proteica (PER): Expresa la aptitud de una proteína para promover el crecimiento del animal. Se calcula de acuerdo a la fórmula:

$$PER = \text{Ganancia de peso(g)} / \text{Proteína consumida(g)}$$

2.5.3.4 Coefficiente de utilización proteica (NPR): Este método utiliza 2 grupos de ratas; el primero se alimenta con una dieta cuya proteína es la proteína que se desea evaluar y un segundo grupo que recibe una dieta sin proteína. Se considera que la pérdida de peso del grupo de ratas que reciben la dieta sin proteína representa la cantidad de proteína necesaria para el mantenimiento. Se calcula con la fórmula:

$$N.P.R. = \frac{\text{Ganancia de peso del grupo experimental(g)} + \text{Pérdida de peso del grupo sin proteína(g)}}{\text{Proteína consumida por el grupo experimental(g)}}$$

2.5.3.5 Digestibilidad aparente del nitrógeno (DAN): La digestibilidad aparente de un nutriente expresa la proporción del nutriente que es aparentemente digerida por el animal. Se determina estableciendo un balance entre la cantidad del nutriente ingerido por el animal y la cantidad excretada (en las heces) de ese mismo nutriente. Se denomina aparente porque la excreción no está formada únicamente por nutrientes no digeridos, sino también por excreciones endógenas como el nitrógeno de las células de descamación, las secreciones de enzimas proteicas, etc.). Sin embargo en una misma especie, se considera que la excreción endógena es similar entre individuos de edades iguales y alimentados con concentraciones similares de proteína y energía, en esta forma es posible clasificar los nutrientes de acuerdo a su digestibilidad aparente. Se calcula con la fórmula:

$$\text{DAN} = \frac{\text{Nitrógeno consumido(g)} - \text{Nitrógeno excretado(g)}}{\text{Nitrógeno consumido(g)}} \times 100$$

2.6 Diseño experimental y análisis estadístico de los resultados:

Los resultados de las actividades de las proteasas comerciales determinada sobre caseína fueron analizadas para cada una de las dos temperaturas estudiadas mediante un análisis de varianza. La suma de cuadrados asociada a la actividad enzimática se descompuso en comparaciones ortogonales entre enzimas bacterianas y fúngicas; y entre enzimas neutras y alcalinas.

Los datos del experimento de hidrólisis de proteína de pescado fueron

analizados de acuerdo a un diseño factorial 3 X 3. Los factores estudiados fueron concentración de enzima y tiempo de reacción. La suma de cuadrados asociada a los efectos principales: tiempo y concentración fue disociada en sus componentes lineal y cuadrático respectivamente.

Se comparó el valor nutricional de la proteína del hidrolizado obtenido en planta piloto con un hidrolizado comercial y con caseína. Los resultados obtenidos para los diferentes parámetros nutricionales estudiados, fueron sometidos a una prueba de comparación múltiple de medias (24,30). Los resultados del experimento de suplementación con L-Lisina de síntesis fueron sometidos a un análisis de varianza y el efecto de la suplementación con L-Lisina, fue disociado en sus componentes lineal y cuadrático (24,30).

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Selección de Materia Prima.

Las especies adecuadas para ser utilizadas como materia prima en procesos de hidrólisis de pescado a escala industrial son la sardina y la anchoveta, también pueden ser utilizadas como materia prima, los subproductos de la industria de enlatado de atún que representan 50% de la proteína procesada, y la fauna de acompañamiento de la pesca del camarón, que por su tamaño o por razones socioculturales, no se consume como pescado fresco. En ambos casos los problemas de aprovisionamiento deberán ser estudiados y resueltos.

El precio actual de la sardina y de la anchoveta industrial es de aproximadamente 60,000 pesos/tonelada, al desembarco. Este precio será considerado en la evaluación económica de este proyecto. Sin embargo las especies indicadas para este tipo de proceso no se encuentran disponibles en la ciudad de México, por razones de facilidad y por la similitud de su composición química con la de la sardina y anchoveta industriales (Cuadro 9), se seleccionó el pescado "Lisa" (Mugil cephalus).

Cuadro 9. Composición de las especies Lisa, Sardina y Anchoveta (%).

	Proteína	Humedad	Grasa
Lisa ¹	17.3	66.6	11.6
Lisa ²	19.4	69.8	8.6
Sardina ²	18.7	78.3	8.0
Anchoveta ²	18.0	73.3	6.0

¹Determinadas en el laboratorio (media de 5 muestras).

²Malcolm W and S. Barlow. 1981 Introduction to fishery by products. Fishing news books Ltd. Farnham, Surrey, England.

Las ventajas de utilizar especies de bajo valor comercial, subproductos de la fauna de acompañamiento o de la industria de enlatado en procesos de hidrólisis enzimática de pescado es que permiten obtener proteínas de un alto valor nutricional a precios reducidos. Considerando los costos reportados de materia prima (pescado), de equipo, de hidrólisis y de recuperación del producto para procesos similares (27), estimamos que la fabricación de un hidrolizado de proteína de pescado con un contenido de 80% de proteína tendría un costo de venta de aproximadamente 1000 dls/ton. Este valor es 3 a 4 veces menor que el de una cantidad equivalente de proteína de leche en forma de leche descremada en polvo (Cuadro 10).

Cuadro 10. Costo actual de proteínas de diversas fuentes.

Origen	Contenido de proteína (%)	pesos/Kg	pesos/Kg de proteína
Carne bovina	19.5	10000 ¹	51280
Leche	3.4	800	23500
Leche descremada en polvo	33.0	4750	14300
Huevo	12.8	2600	20310
HPP	80.0	3000	3750

¹Los precios dados corresponden al mes de septiembre de 1988.

3.2 Determinación de las condiciones de hidrólisis a escala Laboratorio.

3.2.1 Selección de la enzima.

Las actividades de las proteasas comerciales estudiadas, determinadas sobre un sustrato de caseína se reportan en el Cuadro 11.

CUADRO 11. Resultados de las actividades de diversas proteasas comerciales (U.M.¹ sobre caseína a 40 y 55°C

Enzima	Origen	Tipo	40°C	S.E. ²	55°C	S.E.
Brev-N-zime	<u>B. subtilis</u>	Neutra	136.5 ³	0.7	184.2	3.7
HT-Proteolitic-200	<u>B. subtilis</u>	Neutra	141.1	8.7	179.7	4.1
Mucotase	<u>B. subtilis</u>	Alcalina	215.3	1.4	273.1	1.6
Panzin	<u>A. oryzae</u>	Acida	11.7	0.4	7.6	0.1
Takabate 380	<u>B. subtilis</u>	Alcalina	103.5	1.9	231.4	1.5
Tostin	<u>A. oryzae</u>	Neutra	7.8	0.6	4.1	0.1

Análisis de tendencias.⁴

Valor de F

Probabilidad

Bacterianas vs Fúngicas

1152.4

10⁻⁶

Alcalinas vs neutras

419.6

10⁻⁶¹Unidades Warthrop/g de caseína.²Error estándar.³Los valores reportados son medias de 3 repeticiones.⁴Descomposición ortogonal de la suma de cuadrados asociada al efecto de la proteasa.⁵P<.01

Los resultados reportados muestran que de las enzimas estudiadas, las proteasas bacterianas de B. subtilis presentan mayor actividad (P<.01) que las proteasas fúngicas de A. Oryzae, a las dos temperaturas estudiadas.

Igualmente el análisis de los resultados muestra evidencia significativa (P<.01) de una mayor actividad de las proteasas alcalinas, comparadas con las proteasas neutras.

Los costos absolutos y relativos de las enzimas se encuentran en el cuadro 12.

Cuadro 12. Costos por Kg y por unidad de actividad de enzimas proteolíticas comerciales¹.

Enzima	Costo Pesos / Kg ²	Costo Pesos / U. N. ³
Brew-N-zyme	38123	0.21
HT-Proteolytic-200	23144	0.13
Maxatase	57025	0.21
Panzima	5750	0.76
Takabate 380	27950	0.12
Tendrin	3700	0.90

¹Actividad determinada sobre caseína a 55°C.

²Septiembre de 1980.

³Unidades Northrop.

En base a las actividades expresadas en pesos/U.N.; dos enzimas neutras, Brew-N-zyme y HT-Proteolytic-200 y dos alcalinas Maxatase y Takabate 380 son marcadamente más baratas que Tendrin y Panzima. De las 4 enzimas señaladas las más económicas son HT-Proteolytic-200 y Takabate 380. Se considera que la hidrólisis en condiciones neutras tiene diversas ventajas sobre la hidrólisis alcalina.

1. Se reduce el costo por concepto de álcali.
2. Se ha reportado que a pH elevado (9.0-11.0) la proteína sufre daños tales como la racemización de los aminoácidos y la formación de complejos tóxicos como la lisinoalanina.
3. Los costos de mantenimiento del equipo son menores porque existe menor corrosión de los mismos.

En base a la relación costo/actividad de las enzimas y a las ventajas inherentes a un proceso en condiciones de pH neutro, se seleccionó la enzima HT-Proteolytic-200. La información técnica acerca de HT-Proteolytic-200 se proporciona en el cuadro 13.

Cuadro 13. Información técnica acerca de HT-Proteolytic-200¹.

Actividad reportada	200 U.N. ² /g
pH óptimo	6.5-8.0
Intervalo de actividad	5.0-9.5
pH de estabilidad	5.5-10.5
Intervalo óptimo de temp.	45-55°C
Intervalo efectivo de temp.	45-60°C

¹Enmex, S.A. de C.V., Río Lerma No. 228, Tlanepantla, Mex. 54030. México.

²Unidades Northrop.

Las curvas de actividad proteolítica determinada sobre caseína en función del pH y de la temperatura para la proteasa comercial HT-Proteolytic-200 (Enmex) se presentan en las figuras 4 y 5.

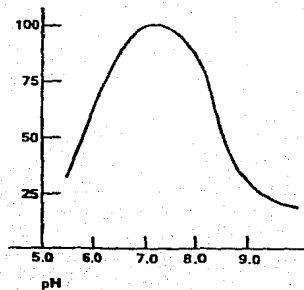


FIGURA 4. EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD

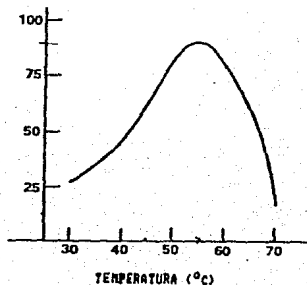


FIGURA 5. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD

3.2.2 Efecto de la temperatura y del tiempo sobre la actividad proteolítica residual de HT-Proteolytic-200.

En experimentos preliminares realizados en el laboratorio se determinaron las condiciones de inactivación de la enzima seleccionada. Se estudió el efecto del tiempo y de la temperatura sobre la actividad proteolítica residual determinada sobre caseína. Los resultados se encuentra en el cuadro 14.

Cuadro 14. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la actividad residual de HT-Proteolytic-200.

Tiempo (min)	Temperatura (°C)		
	70	80	90
5	60.8 ¹	0.8	0.7
10	12.3	0.5	0.5
15	11.6	0.4	0.4
Análisis de tendencias		Nivel de significancia	
Lineal para temperatura		** ²	
Cuadrático para temperatura		**	
Lineal para tiempo		*	
Cuadrático para tiempo		*	
¹ Medio de dos repeticiones.			
² **P<.01; *P<.05; N.S. No significativo.			

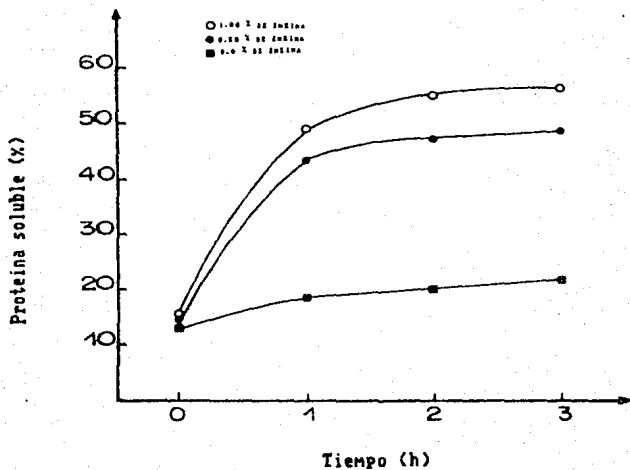


FIGURA 6. Efecto de la concentración de HT-Proteolitic-208 sobre la solubilización de proteína de pescado a 55°C.

El análisis de los resultados muestra una disminución de la actividad de HT-Proteolytic-200 asociada al aumento de la temperatura ($P < .01$) y al aumento del tiempo de inactivación ($P < .05$). La disminución de la actividad de HT-Proteolytic-200 progresa en forma más acelerada con respecto al aumento de la temperatura, que respecto al aumento del tiempo. Existe evidencia experimental positiva que la disminución de la actividad proteolítica asociada a los factores estudiados (temperatura y tiempo) puede ser explicada por un modelo de regresión de tipo cuadrático (Cuadro 14). Esta tendencia cuadrática implica una reducción en la actividad proteolítica muy rápida durante los primeros minutos, para el caso del tiempo o para el primer incremento de la temperatura de 70 a 80°C en el caso de la temperatura, y una reducción cada vez menor al continuar incrementándose ambos parámetros. En términos concretos el análisis muestra que la temperatura es un factor de mayor importancia para explicar la inactivación de la proteasa que el tiempo. Los resultados sugieren que es más conveniente elevar la temperatura por tiempos cortos que prolongar el tiempo de inactivación a temperaturas inferiores (Cuadro 14).

3.3 Selección de un método de determinación de proteína soluble.

Inicialmente se utilizó el método del biuret para la determinación de la proteína soluble (Cuadro 15). Sin embargo, los resultados no fueron reproducibles. Un factor que podría explicar

este problema es la presencia de grasa en el sustrato, lo que aparentemente afectaría las lecturas espectrofotométricas. Con el fin de resolver este problema, se estudiaron dos métodos adicionales para determinación de proteína: el método de Kjeldahl y el método de Indofenol (42). En el cuadro 9 se muestran los resultados del análisis comparativo de 4 muestras con los 3 métodos propuestos.

Cuadro 15. Valores de nitrógeno soluble (%) obtenidos en experimentos de hidrólisis con pescado fresco entero por diversos métodos analíticos.

Muestra ¹	Biuret.	Kjeldahl	Indofenol
A	52.1	51.9	50.6
B	42.6	52.6	51.5
C	43.9	48.3	49.1
D	31.7	51.2	50.8
Media	42.6	51.0	50.5
S.D. ²	8.4	1.9	1.0

¹Las muestras reportadas fueron sometidas a las mismas condiciones de hidrólisis (2 h, 0.9% enz (p/p) con respecto al pescado fresco).

²Desviación estándar.

Los resultados muestran que el método del biuret presenta una elevada variabilidad (S.D.=8.4) comparado con los métodos de Kjeldahl o de indofenol. El método de Kjeldahl es considerado un método de referencia, sin embargo, su determinación requiere un período de tiempo largo y la cantidad de reactivos necesarios es elevada. Los

resultados obtenidos por el método de indofenol comparado con el método de kjeldahl son similares. Por razones de tiempo y facilidad de determinación se seleccionó el método de indofenol para la determinación de proteína en los experimentos de hidrólisis de pescado.

3.4 Efecto de la concentración de enzima sobre la hidrólisis de proteína de pescado.

Trabajando bajo las condiciones de pH y temperatura óptimos reportados por el fabricante para HT-Proteolytic-200 se estudió a nivel laboratorio el efecto de la concentración de proteasa y del tiempo de hidrólisis sobre la solubilización de la proteína de pescado.

Los resultados del experimento de hidrólisis se encuentran en el cuadro 16.

Cuadro 16. Efecto del tiempo y concentración de HT-Proteolytic-200 sobre la solubilización de proteína de pescado.

Enzima (%) ¹	Tiempo (h)		
	0 h	1 h	3 h
0.0	15.5 ²	25.0 ³	27.5
0.5	23.4	43.5	48.9
1.0	27.7	47.7	55.6

Efectos	S.C. ⁴	Nivel de significancia
Enzima	4313.96	** ⁵
Tiempo	4658.15	**
Enzima X Tiempo	473.94	**

Análisis de tendencias		
Lineal para enzima	3386.75	**
Cuadrático para enzima	927.24	**
Lineal para tiempo	4273.45	**
Cuadrático para tiempo	384.60	*

¹Porcentaje en peso con respecto a la proteína del sustrato.

²Proteína en solución en el sobrenadante después de centrifugar el medio de reacción a 10000 x g durante 10 min.

³Los valores son los promedios de 3 repeticiones.

⁴Suma de cuadrados.

⁵**P < 0.01; *P < 0.05

La interacción significativa enzima X tiempo es explicada por diferencias en las pendientes de la proteína soluble para las diferentes concentraciones de enzima y tiempo estudiadas (Fig. 1), sin embargo a pesar de ser significativa, la interacción no invalida

las tendencias encontradas. En efecto los cuadrados medios para los efectos lineal y cuadrático de tiempo y concentración de enzima son marcadamente más elevados que el de la interacción (Cuadro 16).

Los resultados muestran un aumento en la proteína de pescado solubilizada asociado al incremento de la concentración de proteasa (P<.01) y al tiempo de hidrólisis (P<.01). Para los niveles de enzima estudiados la solubilización de la proteína fué asociada significativamente a un efecto de tipo cuadrático tanto para el tiempo (P<.01) como para la concentración de enzima (P<.05). Esto implica que el aumento de solubilización de la proteína con respecto al tiempo es muy acelerado para la primera hora y después tiende a estabilizarse. El mismo efecto se observa para el aumento de la proteína soluble con respecto al incremento de la concentración de enzima, en donde la solubilización aumenta rápidamente para una concentración de 0.5% y posteriormente el incremento es menor.

Los valores obtenidos en este experimento de hidrólisis son menores que valores reportados en la literatura científica para experimentos de hidrólisis similares (22,36,39). Lalasidis (22) reporta porcentajes de hidrólisis de 86% empleando 0.62% de alcalasa a 50°C y pH de 8.5 y usando como sustrato filete de bacalao. Sen (36) reporta 69.7% de hidrólisis empleando 0.1% de papaína a 55°C y pH de 7.0 y músculo de Barbus carnaticus como sustrato y 68.8% de hidrólisis en las mismas condiciones cuando el sustrato utilizado fué músculo de Rastrelliger canagurta. Tarky (39) reporta un rendimiento de 62.6% empleando la proteína de desperdicio del fileteado de Parophrys vetulus con pepsina 1:10,000 a 37°C durante 3 horas a un pH de 2.0. Dos factores explican los menores porcentajes de solubilización de la proteína obtenidos en nuestro trabajo:

1º El método para determinar la proteína en solución en nuestro experimento fué aplicado después de centrifugar la solución de reacción a una fuerza de 10000 X G durante 10 minutos. Las condiciones empleadas para separar la proteína soluble de la fracción insoluble en los experimentos reportados (22,36,39) se llevaron a cabo bajo condiciones de centrifugación o de filtración más suaves. Experimentos recientes en nuestro grupo de trabajo empleando un método de filtración para separar la fracción soluble, resultó en porcentajes de solubilización de proteína de pescado de entre 80 y 90% de la proteína total (Baca Diaz R, Peña Vera M. T. y Diaz Castañeda M. Comunicación personal. 1988.)

Los resultados que discutiremos más adelante del experimento en la planta piloto muestran porcentajes de solubilización más elevados empleando un método de filtración.

2º Para trabajar en condiciones similares a las de la industria de procesamiento de pescado se utilizó el pescado eviscerado para evitar contaminación con enzimas propias del tracto digestivo de pescado, el pescado eviscerado fué molido entero. Un mayor contenido de material proteico de difícil degradación (escamas, cartilago y piel) puede explicar parcialmente los menores porcentajes de solubilización obtenidos.

En base a los resultados reportados (Cuadro 16) se seleccionó una concentración de 0.5% de HT-Proteolytic-200 con respecto a la proteína cruda del sustrato, se consideró que para ésta concentración de proteasa, el porcentaje de proteína soluble por unidad de enzima es el más elevado. Los resultados sugieren que bajo las condiciones del experimento el tiempo hidrólisis adecuado es de 3 horas. Tiempos mayores de hidrólisis deberán ser juzgados en términos de costo/beneficio."

3.5 Hidrólisis en Planta Piloto.

El proceso se llevó a cabo en planta piloto reproduciendo las condiciones seleccionadas en el laboratorio, en el mantenimiento de los parámetros físicoquímicos pH y temperatura.

La agitación del medio de reacción debe permitir que existan condiciones semejantes de pH, temperatura, concentración de enzima y sustrato en todo el medio de reacción.

La hidrólisis se llevó a cabo por un período de 3 horas en un fermentador New Brunswick (figura 7).

La inactivación de la enzima durante 10 minutos a 85°C permitió, en base a resultados obtenidos en la medición de actividad proteolítica residual, que la enzima no tuviera actividad residual.

La separación de grasa de la solución obtenida se llevó a cabo por decantación de la solución del hidrolizado de proteína de pescado en recipientes de nalgene con capacidad de 20 litros por un período de 48 horas a 4°C, permitiendo la separación de dos fases, de las cuales la inferior correspondió a la solución de hidrolizado y la superior a la grasa.

El secado de la solución de hidrolizado de proteína de pescado se llevó a cabo en un secador Niro Atomizer (figura 8) bajo las condiciones siguientes:

Temperatura de entrada de aire de 206°C y temperatura de salida de aire de 94°C. La velocidad de flujo de 8 litros/h permitió que el contenido de sólidos totales del polvo obtenido fuera del 97.2%.

Los resultados obtenidos en la planta piloto para cada una de las etapas del proceso se muestran en la figura 9.

Los rendimientos obtenidos, determinados como porcentaje de recuperación de proteína y de materia seca, se resumen a continuación:

El proceso de hidrólisis permitió recuperar 65.2% de la proteína del sustrato de pescado fresco. El rendimiento final del hidrolizado de proteína de pescado fue de 16% con respecto al pescado fresco. Estos rendimientos, obtenidos a escala de planta piloto, son similares a los reportados para procesos a escala industrial en diversos estudios (27,34,36). En efecto se considera que una recuperación cercana a 10% de producto final con respecto al peso fresco de la materia prima es un rendimiento adecuado en este tipo de procesos, que permite que el proceso sea rentable en términos económicos (29).

Un rendimiento de 10% de producto final, si se considera la recuperación de la fracción lipídica de aproximadamente 5%, representa la recuperación de 50% de la materia procesada.

Diversas etapas del proceso deberán ser estudiadas con más detalle en experimentos posteriores. El método empleado para separar los lípidos, es simple y no requirió equipo especial, pero es probable que métodos de separación por centrifugación sean más eficientes (34). La inactivación de la enzima después de la reacción de hidrólisis es una etapa importante del proceso. En la industria la elevación de la temperatura y el enfriamiento posterior pueden realizarse en intercambiadores de calor.

Durante la inactivación de la enzima, la evaporación y el secado, pueden haber pérdidas en el valor nutricional de la proteína debido a

pérdidas en la biodisponibilidad de algunos aminoácidos, principalmente la L-Lisina. Para verificar esta hipótesis se llevó a cabo un experimento que consistió en determinar el valor nutricional de la proteína obtenida, mediante la elaboración de 3 dietas. Dos de ellas se prepararon con el hidrolizado y una fuente externa de L-Lisina a dos niveles de concentración, mientras que la dieta restante se preparó solamente con el hidrolizado como única fuente de proteína.

3.6 Análisis Microbiológico del HPP.

Los resultados de las determinaciones de la calidad microbiológica del HPP mostraron ausencia de cuentas totales, coliformes, hongos y levaduras en el producto final. Estos resultados sugieren que un HPP elaborado por un proceso como el propuesto sería apto en términos de calidad microbiológica para consumo tanto animal como humano.

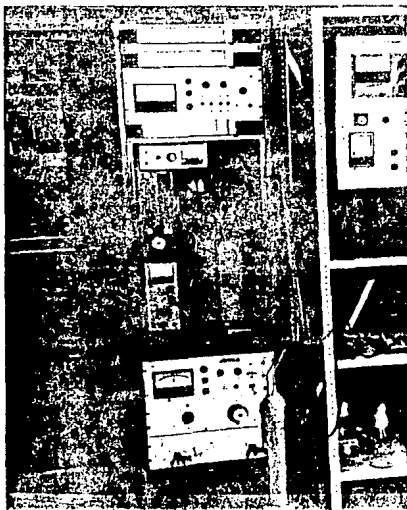


FIGURA 7. FERMENTADOR NEW BRUNSWICK USADO EN LA
HIDROLISIS DE PROTEINA DE PESCADO

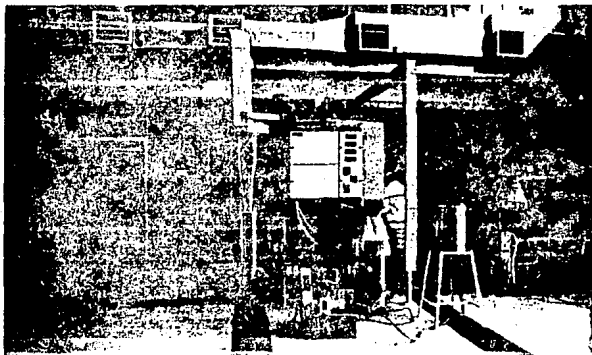


FIGURA 8. SECADOR PILOT MINOR USADO EN LA
PLANTA PILOTO

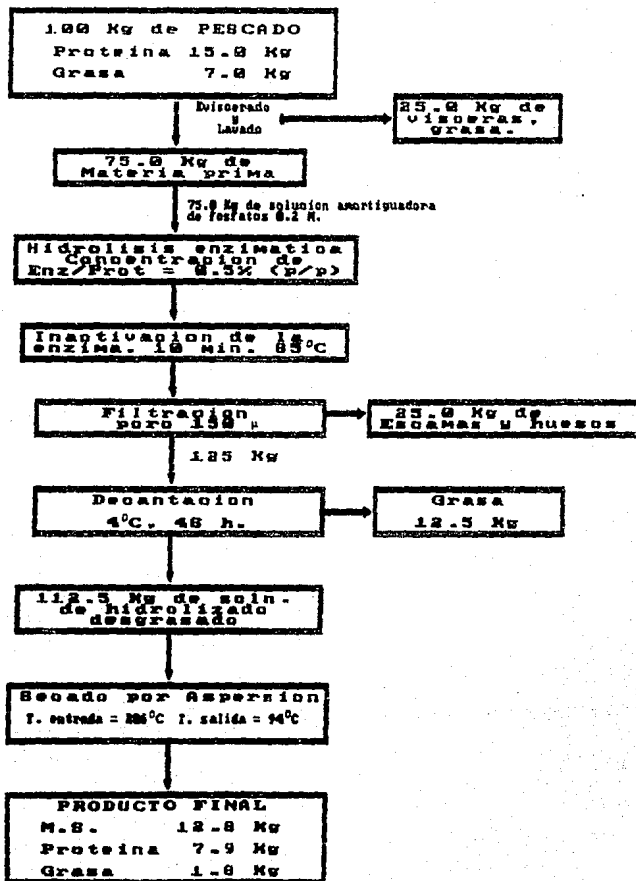


FIGURA 9. DIAGRAMA DEL PROCESO DE
HIDROLISIS EN PLANTA PILOTO

3.7 Determinación del valor nutricional del HPP.

3.7.1 Experimento 1.

Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en el cuadro 17.

Cuadro 17 Resultados de Ganancias de peso (GP); Ingestión (Ing); Conversión alimenticia (TCA); Eficacia proteica (PER); Utilización neta de proteína (NPR) y Digestibilidad aparente del nitrógeno (DAN) en el experimento 1.¹

Dieta	GP (g)	Ing. (g)	TCA	PER	NPR	DAN (%)
Caseína	70.4 ²	303.1	4.32	2.62	3.21	91.25
HPP comercial	70.8	299.6	4.96	2.36	3.22	87.30
HPP experimental	71.9	300.1	4.21	2.94	3.49	87.10
S.E. ³	3.5	7.3	0.27	0.11	0.10	0.61

¹Promedios de 6 animales por dieta.

²No se encontró diferencia significativa entre los parámetros nutricionales medidos.

³Error estándar.

El análisis de los resultados obtenidos muestra que el HPP elaborado con el proceso enzimático propuesto es capaz de sostener ganancias de peso y conversiones alimenticias similares ($P < 0.01$) a las obtenidas con una proteína de alta calidad como la caseína. En efecto los resultados obtenidos para todas las variables excepto la digestibilidad del nitrógeno, en las dietas

con el HPP experimental fueron ligeramente mejores comparadas con un concentrado de proteína de pescado soluble comercial, y con caseína, esta tendencia no fué estadísticamente significativa (Cuadro 17).

Los criterios de calidad de la proteína utilizados, tales como el PER y el NPR, sugieren que el proceso mantiene la calidad nutricional de la proteína de pescado. En efecto los valores de PER y NPR, obtenidos para el HPP elaborado en la planta piloto, son elevados incluso en comparación con valores reportados para productos similares en la literatura científica (14).

Estos resultados sugieren un patrón de aminoácidos del producto equilibrado, en que los aminoácidos esenciales se encuentran en cantidades suficientes para sostener el crecimiento de los animales. La digestibilidad aparente del nitrógeno fué similar a la del producto comercial y solo ligeramente inferior (no significativamente) a la de la caseína, la menor digestibilidad aparente del nitrógeno en el HPP experimental puede deberse a un contenido más elevado de cenizas provenientes de la solución amortiguadora. En todos los casos los valores de digestibilidad obtenidos son elevados. Las elevadas digestibilidades obtenidas sugieren que la hidrólisis enzimática facilita la digestión de la proteína. En términos nutricionales el proceso puede ser comparado a una predigestión de la proteína de pescado. Los valores más reducidos de digestibilidad del nitrógeno para harinas de pescado reportados en la literatura (3) apoyan esta sugerencia.

3.7.2 Experimento 2.

El HPP obtenido en planta piloto fué sometido a tratamiento térmico tanto para inactivar la enzima como para su secado. Existe evidencia científica reportada (37) que muestra que el tratamiento térmico de una proteína produce pérdidas de su valor nutricional asociadas principalmente a disminuciones en la biodisponibilidad de la L-Lisina.

Para determinar si el proceso de elaboración del hidrolizado de proteína de pescado afecta la calidad nutricional de la proteína, se evaluaron en pruebas "in vivo" dietas elaboradas con el HPP-experimental sin y con diversos niveles de suplementación de L-Lisina de síntesis. Los resultados de este experimento se encuentran en el cuadro 18.

Cuadro 18. Ganancias de peso (GP), Ingestión (Ing), Conversión alimenticia (TCA), Eficacia proteica (PER), Utilización neta de proteína (NPR) y Digestibilidad aparente del nitrógeno (DAN) en el Experimento 2.

Dieta	GP ¹ (g)	Ing. (g)	TCA	PER	NPR	DAN (%)
HPP sin Lisina	98.5 ²	349.7	3.66	2.58	2.99	89.32
HPP+ .2% Lisina	95.8	324.6	3.41	2.68	3.12	88.22
HPP+ .4% Lisina	95.9	339.1	3.56	2.62	3.04	88.67
S.E. ³	4.47	10.18	0.10	0.07	0.07	0.36

¹Promedios de 6 animales por dieta.

²No existen diferencias significativas entre los tratamientos.

³Error estándar.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Los resultados del experimento de suplementación con L-Lisina de síntesis, muestran evidencia significativa ($P < 0.05$) de que no existe efecto de la adición de L-Lisina sintética en la dieta, sobre las ganancias de peso, la ingestión, la conversión alimenticia y el valor nutricional de la proteína medido por el PER y el NPR (Cuadro 18). Tampoco se observó evidencia significativa ($P < 0.05$) de efecto de la suplementación con L-Lisina sobre la digestibilidad del nitrógeno de las dietas.

La ausencia de efecto de la suplementación con L-Lisina sugiere que la L-Lisina contenida en la proteína de pescado no sufre daños durante el proceso de hidrólisis, durante la inactivación de la enzima ni en la etapa de secado por aspersión. Los valores elevados de GP, PER y NPR obtenidos en el Experimento 1 concuerdan con estos resultados.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los experimentos de hidrólisis enzimática de proteína de pescado a escala laboratorio y de planta piloto, sugieren las siguientes conclusiones:

- 1) Es posible obtener porcentajes elevados de recuperación de la proteína de un sustrato de pescado fresco utilizando proteasas bacterianas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo con HT-Proteolytic-200 apoyan esta sugerencia.
- 2) Las proteasas bacterianas comerciales tienen un bajo costo por unidad de actividad y un intervalo amplio de condiciones de pH y temperatura de actividad, esto, permite desarrollar un proceso competitivo en términos económicos.
- 3) Dentro del intervalo de condiciones estudiadas, los valores más elevados de solubilización de la proteína de pescado con la enzima HT-Proteolytic-200 fueron obtenidos bajo las siguientes condiciones:
 - a) Concentración 0.5% p/p con respecto a la proteína del sustrato.
 - b) Tiempo de hidrólisis de 3 horas.
 - c) Relación agua:sustrato de 2:1.
- 4) La hidrólisis de proteína de pescado con HT-Proteolytic 200 permitió solubilizar hasta 65% de la proteína total del sustrato.

5) El escalamiento a nivel bench permitió recuperar en el producto final 65% de la proteína del sustrato. Con respecto al pescado fresco, la materia recuperada al final del proceso representó 16% del sustrato inicial y entre 50 y 55% de la materia seca procesada.

6) Llevar a cabo la reacción de hidrólisis a una temperatura de 55°C, reduce los riesgos de contaminación bacteriana.

7) El producto obtenido tiene un valor nutricional comparable al de la caseína de la leche y al de un hidrolizado de proteína de pescado comercial.

8) El efecto del calor durante el proceso de hidrólisis y el secado, no produjo reducciones del valor nutricional de la proteína de pescado hidrolizada, ni pérdidas de la biodisponibilidad de la L-Lisina de la proteína.

BIBLIOGRAFIA

1. Allen, R. D. Feedstuffs ingredient analysis table: 1980 Edition. Feedstuffs year book issue.
2. Association of Official Agricultural Chemistry A.O.A.C. 1975. Official methods of analysis. 11th. Ed. Washington, D.C.
3. Bender, A.E. and B.H. Doell. 1957. Biological evaluation of proteins: a new aspect. British J. Nutr. 11:140.
4. Bertullo, V. 1973. Tecnología de los productos y subproductos de pescados, moluscos y crustáceos. Ed. Hemisferio Sur. 1a. Ed. México. pp 427
5. Chapman, D.G., R. Castillo and J.A. Campbell. 1959. Evaluation of proteins in foods. Method for determination of protein efficiency ratios. Can J. Biochem Physiol 37:679.
6. Clifford A. J. 1985. The whole animal as an analytical tool. Food analysis principles and techniques. Biological techniques. D. W. Gruenwedel and J. R. Whitaker Edit. Marcel Dekker Inc. New York, N.Y. Vol. 3
7. Díaz Castañeda, M. 1987. Replacement of skimmed milk with hydrolyzed fish protein and nixtamal in milk substitutes for dairy calves. J. Dairy Sci 70:130.
8. Escalante, A. C. 1983. Estudio para la obtención de un concentrado proteínico mediante hidrólisis enzimática a partir de anchoveta (Eugraulis mordax). Tesis Licenciatura. Universidad Iberoamericana. México, D.F.
9. F.A.O. 1961. Empleo de concentrados de proteína de pescado ("Fish Fluor" y "Fish Meal") para el consumo humano. Reunión Internacional sobre harina de pescado. Roma.
10. F.A.O. 1961. Futura evolución de la producción y utilización de la harina de pescado. Reunión Internacional sobre harina de pescado. Roma.
11. F.A.O. 1985. Quinta Encuesta Alimentaria Mundial. Roma.
12. Finch, R. 1977. Whatever happened to fish protein concentrate? Food Technol 31:44.
13. Frazier, W.C. 1972. Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia. España. 2a. Ed. pp 497.
14. Friedman, M. Ed. 1978. Nutritional improvement of food and feed proteins. Plenum Press. N. Y. and London. pp 37.

15. Gálvez, M. A., J. Morales and H. Bourges. 1985. Development of an enzymatic fish hydrolysate and its use in instant soup bases. Arch Latinoamer Nutr 35:686
16. Godfrey T. and Reichelt J. R. 1983. Industrial Enzymology: The applications of enzymes in industry. Mc. Millan Ed., London.
17. Hale, M.B. 1969. Relative activities of commercially available enzymes. Food Technol 23:107
18. Hale, M.B. 1974. Using enzymes to make fish protein concentrates. Marine Fisheries Review. 36:15.
19. Heen, E. and R. Kreuzer. 1962. Fish in nutrition. Fishing news Ltd. London.
20. Instituto Nacional de la Nutrición. 1977. Valor Nutritivo de los Alimentos Mexicanos. Tablas de uso práctico. México, D.F.
21. Jenkins, K.J., D.B. Emmons, E. Larmond and F.D. Sauer. 1982. Soluble partially hydrolyzed fish protein concentrate in calf milk replacers. J. Dairy Sci 65: 784.
22. Lalasidis, G., S. Bostrom and L.S. Sjoberg. 1978. Low molecular weight enzymatic fish protein hydrolysates: Chemical composition and nutritive value. J. Agric Food Chem 26:751
23. Leiazola, L. 1968. Harina de pescado. Técnica Pesquera. 7:29.
24. Little, T. M., and F. J. Hills. 1978. Agricultural experimentation. Design and analysis. John Wiley and Sons, Inc. New York, NY.
25. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol Chem 193:265
26. Makdani, D. D., Huber J. T. 1971. Nutritional value of 1,2 dichloroethane extracted FPC for young calves fed milk replacer diets. J. Dairy Sci 54:886
27. Mackie, I.M. 1982. General review of fish protein hydrolysates. Anim Feed Sci Technol 7:113
28. Meinke, W.W., A.M. Rahman and K.F. Mattil. 1972. Some factors influencing the production of protein isolates from whole fish. J. Food Sci 37:195
29. Merrit, J.H. 1981. Assessment of the production costs of fish protein hydrolysates. Anim Feed Sci Tech 7:147
30. Montgomery, D.C. 1984. Design and analysis of experiments. Ed. John Wiley and Sons. U.S.A. 2a. Ed.

31. Murillo Corral, C.H. 1979. Ensilaje de pescado para la obtención de forraje económico como alimento de ganado. Ier. Simposio Internacional de Educación y Organización Pesquera. Vol. II. México.
32. Necochea, M.H. 1977. Estudio para el aprovechamiento de especies marinas de bajo valor comercial mediante la elaboración de hidrolizados para consumo humano. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N. México, D.F.
33. Orskov, E.R., H.S. Soliman and C.F.S. Clark. 1981. Use of fish protein hydrolysate in milk replacers. Anim Feed Sci Technol 7:135
34. Potter, D.P., I.N. Tatterson and J. Wignall. 1978. Fish by products-fish meal and fish silage. Process Biochem 13(1):22
35. Secretaría de Pesca. 1987. Anuario Estadístico de Pesca 1987. Dirección General de Informática, Estadística y Documentación. México, D.F.
36. Sen, D.P., N.V. Sripathy, N.L. Lahiry, A. Sreenivasan and V. Subrahmanyam. 1962. Rate of hydrolysis of fish with papain. Food Technol 16:138
37. Sikorski, Z. E. and M. Naczki 1981. Modification of technological properties of fish protein concentrates. CRC. Crit Rev Food Sci Nutr 14(3):201
38. Sparre, T. 1964. Nociones básicas acerca de la elaboración de harina de pescado. Pesca y Marina No. 3. 16:8
39. Tarky, W., O. P. Agarwala and G. M. Pigott. 1973. Protein hydrolysate from fish waste. J. Food Sci 38:917
40. Tellez Sill, V.V. 1978. Obtención de un aislado proteínico a partir de pescado para consumo humano. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N. México, D.F.
41. Walton, S.I., B.B. Lennart and K.B.O. Lennart. 1972. Inventors: Fish protein isolate. U.S. patent 1,348,241. 4p. int. cl2: A 23 J 1/04.
42. Weatherburn, M.W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of amonia. Anal Chem 39:971.
43. Windsor, M. and S. Barlow. 1984. Introducción a los subproductos de pesquería. Ed. Acribia, España. pp 117
44. Whitaker, J.R. 1972. Principles of enzymology for the food sciences. Ed. Marcel Dekker, Inc. New York.