

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS OBTENIDOS A TRAVÉS DE LA
HIDRÓLISIS CON ENZIMAS DIGESTIVAS DEL ATÚN ALETA AZUL *Thunnus
orientalis***

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

CON ORIENTACIÓN EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

BIOL. ARIANA IVEETT ROMÁN GAVILANES

Ensenada, B. C., México, a 25 de mayo de 2012.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN ECOLOGIA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS OBTENIDOS A TRAVÉS DE LA
HIDRÓLISIS CON ENZIMAS DIGESTIVAS DEL ATÚN ALETA AZUL *Thunnus
orientalis***

T E S I S


QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

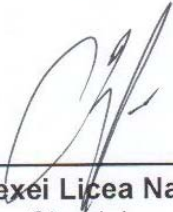
PRESENTA

BIOL. ARIANA IVEETT ROMÁN GAVILANES


Aprobada por:



Dr. María Teresa Viana Castrillón
Directora de tesis



Dr. Alexei Licea Navarro
Sinodal



Dr. Eduardo Durazo Beltrán
Sinodal

RESUMEN

Los subproductos de pescado presentan un potencial para aplicaciones biotecnológicas y procesamiento de alimentos (Haard, 1992), por ser fuente importante de enzimas digestivas que pueden ser utilizadas para fragmentar proteína en péptidos y aminoácidos libres, productos de alto valor agregado conocidos como hidrolizados proteicos, los cuales son de interés en acuicultura y alimentación animal (Nilsang *et al.*, 2005), ya que aumentan la palatabilidad alimenticia, la biodisponibilidad y la absorción de los nutrientes. Aunado a esto, se les ha atribuido algunos beneficios como promotores de crecimiento (Anggawati *et al.*, 1990), entre otros. La maricultura del atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus orientalis*) es una actividad de importancia comercial en la región de Ensenada, B. C., que genera abundantes subproductos; sus vísceras poseen enzimas digestivas con una alta actividad proteolítica. Es así que este estudio se centró en el desarrollo de hidrolizados proteicos con enzimas digestivas del atún aleta azul del Pacífico y en la caracterización de los péptidos obtenidos tras la hidrólisis, en donde a la par se hicieron pruebas industriales de este mismo proceso en la empresa Tecno Protein S. A. de C. V. (El Sauzal, Ensenada, B. C.). Los resultados obtenidos muestran que las proteasas alcalinas totales presentes en el extracto crudo de páncreas del atún aleta azul del Pacífico, presentan mayor actividad en un intervalo de temperaturas de 50 a 65 °C y a pH de 7 a 9 y mantienen su actividad hasta después de su incubación a 4, 24 y 37 °C durante 3 hrs sin cambiar significativamente su actividad. La mayor actividad proteolítica en el extracto enzimático correspondió a la tripsina. El hidrolizado de sardina obtenido

con vísceras de *T. orientalis* es una buena fuente de proteína y aminoácidos, aportando específicamente AAs esenciales como la lisina y leucina por lo que este tipo de productos representan una alternativa al procesamiento de especies de poca importancia económica en harina de pescado. La fracción más abundante en el hidrolizado de sardina obtenido a nivel industrial fue la fracción de componentes insolubles, que al mismo tiempo contiene el menor porcentaje de proteína cruda, lo cual podría ser atribuible al método de secado. La lisina se encontró en mayores cantidades conforme hubo una disminución en el tamaño de las fracciones ultrafiltradas. En las pruebas de laboratorio se demostró que la harina de pescado fue mayormente hidrolizada con el extracto enzimático de páncreas del atún aleta azul, mientras que la harina de soya exhibió una hidrólisis más extensiva con la enzima comercial papaína. La distribución de pesos moleculares de los péptidos presentes en las fracciones solubles de los hidrolizados proteicos de una misma fuente proteica, son diferentes dependiendo del tipo de enzimas hidrolíticas, ya sea con el extracto crudo pancreático o la papaína. Se discute la importancia de este tipo de productos hidrolizados y su repercusión en la industria, así como sobre el potencial de utilización de enzimas de origen marino comparadas con las tradicionales enzimas comerciales de origen vegetal.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la **UABC** por cobijarme durante 8 años de mi vida; al **IIO**, a la **Facultad de Ciencias Marinas** y al **Posgrado de Ecología Molecular y Biotecnología** por formarme como Maestra en Ciencias, y por supuesto, a **CONACYT** por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

De manera muy especial agradezco a la **Dra. María Teresa Viana Castrillón** por permitirme ser su estudiante de maestría, por su apoyo, su atención y toda la enseñanza proporcionada, mil gracias Dra. Para usted Dra., toda mi admiración y respeto.

A mis sinodales el **Dr. Eduardo Durazo Beltrán** y el **Dr. Alexei Licea Navarro** por sus valiosas observaciones y aportaciones a este trabajo.

Gracias a la empresa **Tecno Protein S. A. de C. V.** por formar parte de este proyecto.

Al **IBT** por la ultrafiltración de las muestras y al departamento de **Biotecnología Marina de CICESE**, en especial al **M. C. Eduardo Morales**, por su apoyo en el manejo del HPLC.

Agradezco infinitamente a mi compañero y gran amigo, el **Dr. Emmanuel Martínez Montaña**, por su ayuda en todo momento, su colaboración, su enseñanza y por aventurarse conmigo en el montaje de varias técnicas que desconocíamos y aprendimos juntos.

A mis compañeros en el **Laboratorio de Nutrición y Fisiología**: **Jaime, Servando, Daniel, Fernando, Paola, Edith, Victoria, Moises y Marco**. También al **Dr. Gabriel Correa** y la **M. C. Griselda Parés**, y a todos los que pasaron por el lab: **Jahel, Jorge Dávila, Emyr, Augusto, Martha, Ivette y Jorge Hernández**. Muchísimas gracias a todos por aguantarme y hasta por sacarme una que otra cana.

A mis compañeros de **generación del Posgrado** de Ecología Molecular y Biotecnología: **Carolina, Sharon, Luvia, Itxel, Dora, Karla, Norma, Jovis Catalán, Carlos, Chuy, Emmanuel, Oscar, Homero y Santiago**.

Gracias a mis amigos y colegas: **Desi, Osmín, Plata, Diego Luis, Takita, Pinky, More, Isadora, Aimee y Leo**, gracias por ser mis cómplices en todas mis aventuras.

A mi incondicional amiga la **M. C. Naidy Pinoncely**, y a mis amigas: **Analiz, Beshy, Claudia, Norma, Maslova, Sarahí y Wendy**. Gracias por ser más que mis amigas de siempre y echarme muchas porras.

Gracias a mis padres adoptivos en Ensenada, la **Dra. Rosa Mouriño** y el **Dr. Juan Godínez**, y mi hermanita la **zhurpi**, los quiero mucho, gracias por todo su apoyo, comprensión y cariño, pero sobre todo por hacerme un miembro de su familia.

A mi familia: padres, ti@s, prim@s, sobrin@s, amig@s, a todos gracias por ser parte de mi vida! ...Gracias a la luz que ha llegado para iluminar mis días...

...Y gracias a la vida...que me ha dado tanto!

CONTENIDO

	PÁGINA
LISTA DE CUADROS	9
LISTA DE FIGURAS	11
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	20
2.1 Proteasas	20
2.2 Hidrolizados proteicos	22
2.3 Hidrolizados proteicos de pescado	24
2.4 Maricultura del atún aleta azul del Pacífico	26
2.5 Fisiología digestiva del atún aleta azul del Pacífico	27
3. HIPÓTESIS	29
4. OBJETIVO	30
3.1 Objetivo general	
3.2 Objetivos particulares	
5. METODOLOGÍA	31
5.1 Obtención del extracto crudo pancreático	31
5.2 Ensayos de actividad enzimática	32
5.2.1 Definición de las unidades de actividad total y específica:	34
5.2.2 Cuantificación de proteína soluble	34
5.3 Obtención de los hidrolizados proteicos	35
5.3.1 Hidrolizado proteico de sardina elaborado industrialmente	35
5.3.2 Hidrolizados proteicos obtenidos en el	35

laboratorio

5.4 Análisis proximales	38
5.5 Perfil de aminoácidos	39
5.6 Grado de hidrólisis de los los hidrolizados proteicos obtenidos en el laboratorio	40
5.7 Distribución de pesos moleculares de los péptidos constituyentes de los hidrolizados proteicos	40
5.7.1 Ultrafiltración del hidrolizado proteico de sardina	40
5.7.2 SE-HPLC	40
6. RESULTADOS	42
6.1 Caracterización de las proteasas alcalinas totales presentes en el extracto crudo pancreático	42
6.1.1 Efecto de la temperatura	42
6.1.2 Efecto del pH	43
6.1.3 Participación relativa por grupo de enzimas	45
6.1.4 Estabilidad del extracto crudo de páncreas por incubación a diferentes temperaturas	46
6.2 Caracterización de la actividad proteolítica de la enzima comercial papaína	47
6.2.1 Efecto de la temperatura	47
6.2.2 Efecto del pH	48
6.2.3 Caracterización del hidrolizado proteico de sardina elaborado industrialmente	49
6.3 Caracterización del hidrolizado proteico de sardina elaborado industrialmente	50
6.3.1 Composición proximal	50

6.3.2 Perfil de aminoácidos	51
6.3.3 Distribución de pesos moleculares de los péptidos	51
6.3.4 Análisis proximal de las fracciones ultrafiltradas	51
6.3.5 Perfil de aminoácidos de las fracciones ultrafiltradas	52
6.4 Caracterización de los hidrolizados proteicos desarrollados en el laboratorio	53
6.4.1 Composición proximal y perfil de aminoácidos de las harinas empleadas como fuente proteica	53
6.4.2 Grado de hidrólisis	55
6.4.3 Distribución de pesos moleculares de las fracciones solubles de los hidrolizados	56
7. DISCUSIÓN	61
8. CONCLUSIONES	71
9. REFERENCIAS	73
10. ANEXOS	83

LISTA DE CUADROS

CUADRO	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
I	Principales proteasas de peces y su sitio de especificidad. (Tomado de Guillaume <i>et al.</i> , 2001).	17
II	Actividad específica (U/mg) de las proteasas alcalinas totales del extracto crudo pancreático a diferentes temperaturas.	42
III	Actividad específica (U/mg) de las proteasas alcalinas totales del extracto crudo pancreático a diferentes pHs evaluado, a 37 °C.	44
IV	Porcentaje de actividad, por grupo de enzimas del extracto crudo pancreático, obtenido con el uso de inhibidores específicos.	45
V	Estudio de la actividad de las proteasas alcalinas totales en el extracto crudo pancreático por incubación a 4, 24, 37 y 60 °C durante 1, 2 y 3 hr. Después de la incubación la actividad fue evaluada a 37 °C según el protocolo descrito por Sarath <i>et al.</i> (1989), con modificaciones.	46
VI	Actividad específica (U/mg) de la enzima comercial papaína a diferentes temperaturas.	47
VII	Actividad específica (U/mg) de la enzima comercial papaína a diferentes pHs, evaluado a 37 °C.	49
VIII	Composición proximal del hidrolizado proteico de sardina obtenido industrialmente.	50
IX	Perfil de aminoácidos del hidrolizado proteico de sardina elaborado industrialmente (mg de AA/g de proteína).	51
X	Descripción del porcentaje correspondiente al peso en seco (%PS), el porcentaje de proteína cruda (%PC) y de cenizas (%C), de las de las seis fracciones ultrafiltradas del hidrolizado de sardina.	52
XI	Composición proximal de las fuentes proteicas utilizadas para la obtener los hidrolizados en el laboratorio.	54

XII	Perfil de aminoácidos de la harina de pescado y de la harina de soya (mg de AA/g de proteína).	54
XIII	Cuadro de rendimiento de los hidrolizados obtenidos en el laboratorio con el extracto crudo pancreático de atún aleta azul del Pacífico y con la enzima comercial papaína, utilizando como fuentes proteicas harina de pescado y de soya.	55
XIV	Proteínas utilizadas para la construcción de la curva estándar, empleada para la determinación de pesos moleculares.	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Diagrama de flujo que muestra el esquema general de la metodología del trabajo. ECP = Extracto Crudo de Páncreas; HP = Hidrolizado proteico; HPS = Hidrolizado proteico de sardina; PM = Peso molecular.	32
2	Diagrama de flujo que muestra la metodología para la elaboración industrial del hidrolizado proteico de sardina, caracterizado en este trabajo (Tecno Protein S. A. de C. V., El Sauzal, Ensenada, B.C.).	36
3	Diagramas de flujos que muestran los procesos de obtención de los hidrolizados proteicos en el laboratorio, utilizando el extracto crudo pancreático (A) y la proteasa comercial papaína (B).	37
4	Porcentaje de actividad relativa máxima de las proteasas alcalinas totales presentes en el extracto crudo pancreático a diferentes temperaturas.	43
5	Porcentaje de actividad relativa de las proteasas alcalinas totales presentes en el extracto crudo pancreático a diferentes pHs.	44
6	Porcentaje de actividad relativa máxima de la enzima comercial papaína a diferentes temperaturas.	48
7	Porcentaje de actividad relativa máxima de la enzima comercial papaína a diferentes pHs.	49
8	Porcentaje del peso seco de las seis fracciones ultrafiltradas del hidrolizado proteico de sardina.	52
9	Perfil de aminoácidos para cuatro de las seis fracciones ultrafiltradas, del hidrolizado proteico de sardina.	53
10	Cromatografía de exclusión molecular acoplada a HPLC utilizando la columna Zorbax Bio Series GF-250 (Agilent®). Los cromatogramas muestran la fracción soluble de los hidrolizados de harina de pescado (HP) de las reacciones empleando: extracto crudo pancreático (HPE), ---- papaína (HPP) y — del sustrato (Control). La señal exhibida	57

se monitoreó con UV a 254 nm, el tiempo de corrida fue de 15 min. Se inyectaron 20 µL a una concentración de 5 mg/mL de muestra. En la parte superior de la figura se muestra un eje que proporciona una aproximación del peso molecular correspondiente al compuesto. (mAU = miliunidades de absorbencia).

- 11** Cromatografía de exclusión molecular acoplada a HPLC utilizando la columna Zorbax Bio Series GF-250 (Agilent®). Los cromatogramas muestran la fracción soluble de los hidrolizados de harina de soya (HS) de las reacciones empleando: extracto crudo pancreático (HSE), ---- papaína (HSP) y — del sustrato (Control). La señal exhibida se monitoreó con UV a 254 nm, el tiempo de corrida fue de 15 min. Se inyectaron 20 µL a una concentración de 5 mg/mL de muestra. En la parte superior de la figura se muestra un eje que proporciona una aproximación del peso molecular correspondiente al compuesto. (mAU = miliunidades de absorbencia). **58**
- 12** Cromatografía de exclusión molecular acoplada a HPLC utilizando la columna Zorbax Bio Series GF-250 (Agilent®). Los cromatogramas comparan la distribución del peso molecular de la fracción soluble de los hidrolizados obtenidos con el extracto crudo pancreático al emplear harina de pescado (HPE) — y harina de soya (HSE) como sustrato. La señal exhibida se monitoreó con UV a 254 nm, el tiempo de corrida de 15 min. Se inyectaron 20 µL a una concentración de 5 mg/mL de muestra. En la parte superior de la figura se muestra una aproximación del peso molecular correspondiente al compuesto. (mAU = miliunidades de absorbencia). **59**
- 13** Cromatografía de exclusión molecular acoplada a HPLC utilizando la columna Zorbax Bio Series GF-250 (Agilent®). Los cromatogramas comparan la distribución de pesos moleculares de la fracción soluble de los hidrolizados obtenidos con la enzima comercial papaína al emplear harina de pescado (HPP) y harina de soya (HSP) ---- como sustrato. La señal exhibida se monitoreó con UV a 254 nm, el tiempo de corrida de 15 min. Se inyectaron 20 µL a una concentración de 5 mg/mL de muestra. En la parte superior de la figura se muestra una aproximación del peso molecular correspondiente al compuesto. (mAU = miliunidades de absorbencia). **60**

- | | | |
|-----------|---|-----------|
| 14 | Curva estándar de albúmina de suero de bovino utilizada para la cuantificación de proteína soluble. | 83 |
| 15 | Curva estándar de proteínas obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular-HPLC usando la columna ZORBAX Bio Series GF-250. La fase móvil consistió en solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.018 M, pH 7.0 NaCl 0.11 M. La velocidad de flujo fue 1 mL/min. La absorbencia se monitoreó a 210, 254 y 280 nm. | 85 |
-

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace dos décadas, las pesquerías llegaron a un nivel máximo de captura, y los diversos esfuerzos encaminados en la búsqueda de un aumento en la producción, han sido en vano (FAO, 2010). Para contrarrestar de alguna manera el desabasto de las pesquerías, la opción inminente es la acuicultura. Sin embargo, el cultivo de muchas especies acuáticas depende directamente del abastecimiento de proteína de origen marino para su sustento, por esta razón se hace necesaria la investigación en los requerimientos nutricionales y la búsqueda de nuevos ingredientes para su alimentación, de tal manera que se logre la eficiencia alimenticia de especies que pueden ser cultivadas.

La proteína es uno de los componentes más importantes en el alimento, ya que influye en las características funcionales y nutricionales al proveer de aminoácidos (AAs) esenciales y ser fuente de nitrógeno y energía. El suministro adecuado de proteína en un alimento, radica tanto en el porcentaje de proteína, como en su composición aminoacídica, factor que determina directamente el potencial digestivo, la preferencia en absorción de los péptidos y AAs obtenidos, y el crecimiento generado. El efecto de agregar la proteína parcialmente hidrolizada da lugar a que esta se aproveche mejor. Esto se debe a que la velocidad de absorción de la proteína a nivel intestinal está dada por la velocidad a la que las enzimas digestivas hidrolizan la fuente proteica para que ésta pueda ser absorbida (Espe *et al.*, 1993).

El proceso conocido como hidrólisis, conlleva a la disociación de la estructura primaria de la proteína, y a su fragmentación en péptidos y AAs libres, dando

como resultado hidrolizados proteicos (Rustad, 2003). Estos hidrolizados proteicos, pueden ser obtenidos mediante métodos químicos que involucran el uso de sustancias alcalinas (NaOH) o ácidas (HCl), o bien, con métodos biológicos basados en el uso de enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos (Li *et al.*, 2010), denominadas proteasas, proteinasas, peptidasas o enzimas proteolíticas, que pueden ser exógenas o endógenas.

Los métodos biológicos son preferidos sobre los métodos químicos por presentar indudables ventajas, entre las que destacan: la selectividad de las enzimas, el uso de condiciones moderadas de temperatura y pH, el no añadir sustancias extrañas y mantener el valor nutritivo de la proteína original por no oxidar cisteína y metionina, no destruir serina y treonina, y no convertir glutamina y asparagina en glutamato y aspartato, respectivamente (Bucci y Unlu, 2000).

Para el desarrollo de este tipo de productos, el primer paso es la elección de la fuente proteica a hidrolizar, lo cual se da en función al uso final que tendrá el producto (Guadix *et al.*, 2000). Además, las propiedades del producto están dadas por la selección de la enzima y las condiciones bajo las cuales se llevará a cabo la reacción de hidrólisis (Sikorski *et al.*, 1995; Shahidi y Janak-Kamil, 2001).

Específicamente, los hidrolizados proteicos de pescado, pueden ser obtenidos principalmente de dos forma: (1) mediante un proceso de autólisis, donde actúan las enzimas digestivas propias del pez y (2) por el proceso de hidrólisis empleando proteasas comercialmente disponibles (Mohr, 1977).

En la actualidad un gran número de proteasas se encuentran disponibles en el mercado, cuyo origen puede ser animal, vegetal, bacteriano o fúngico. Estas

pueden tener acción endo o exopeptidasa, es decir, que hidrolizan enlaces internos o en los extremos de la cadena polipeptídica, respectivamente; y con sitios catalíticos de diversa naturaleza, distinguiendo así, entre serina, cisteína, metalo o aspartato proteasas (Guadix *et al.*, 2000).

Muchas de las enzimas digestivas de diversos organismos son proteasas y participan en el proceso de digestión, mediante el cual el organismo degrada el alimento.

En peces, como en otros vertebrados, se distinguen tres principales categorías de enzimas que participan en el proceso digestivo: 1) enzimas de membranas, 2) enzimas de las células del tracto digestivo, y 3) enzimas secretadas por órganos como el páncreas y el estómago (en aquellos peces que poseen un estómago funcional), éstas enzimas son producidas siempre como zimógenos o proenzimas y su activación se da por la escisión de un péptido que cambia la posición del sitio activo. Por ejemplo, para la generación de pepsina en el estómago, inicialmente las células parietales secretan ácido clorhídrico que activa el pepsinógeno y por un proceso auto catalítico se genera la pepsina. Mientras que en el páncreas se sintetizan y secretan importantes enzimas que actúan a un pH alcalino, el proceso se inicia por la activación del tripsinógeno por la enteroquinasa. A partir de esto, se activan una serie de eventos en cascada por acción de la tripsina que actúa sobre el quimiotripsinógeno y posteriormente son activadas otras enzimas pancreáticas: elastasa, colagenasa, carboxipeptidasa A y B, fosfolipasa y colipasa (Guillaume *et al.*, 2001).

Entre las proteasas digestivas más importantes en peces se encuentran la pepsina, tripsina, quimiotripsina, colagenasa y elastasa (Haard, 1990; Simpson, 2000), todas ellas presentan actividad de endopeptidasas, y poseen el mismo tipo de sitio catalítico, que se caracteriza por contener un residuo de serina, a excepción de la pepsina, que es una proteasa aspártica. Cada una de estas enzimas actúa en un tipo de enlace peptídico específico (cuadro I), de tal manera que se complementan en su acción para hidrolizar la proteína.

Cuadro I. Principales proteasas de peces y su sitio de especificidad. (Tomado de Guillaume *et al.*, 2001).

Enzima	Enlaces que hidrolizan
Pepsina	NH ₂ de diácidos aromáticos y aminoácidos en general
Tripsina	-COOH de Arginina o Lisina
Quimiotripsina	-COOH de aminoácidos aromáticos
Elastasa	Aminoácidos alifáticos

Existen un gran variedad de ejemplos sobre las enzimas digestivas ya caracterizadas de diversas especies de peces tales como: capelín (*Mallotus villosus*; Hjelmeland y Raa, 1982), bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*; Gildberg, 1992), bonito (*Katsuwonus pelamis*; Klomklao *et al.*, 2004), atún aleta amarilla, (*Thunnus albacora*; Li *et al.*, 2010), y al ser fuente de enzimas proteolíticas, las vísceras de estas y otras especies de pescado, poseen un gran potencial biotecnológico (Haard, 1992).

En la región de Baja California la maricultura del atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus orientalis*) es una actividad de importancia económica que genera grandes cantidades de subproductos, los cuales son escasamente utilizados o simplemente descartados, ocasionando problemas ambientales. Es así que cerca de unas 900 toneladas, fueron reportadas para el ciclo 2007-2008 (Zertuche-González *et al.*, 2008). No obstante, estos subproductos que incluyen masa pancreática y estómago, son fuente de enzimas digestivas con alta actividad proteolítica, que actúan en amplios rangos de pH y temperatura (Matus de la parra *et al.*, 2007).

El objetivo central del presente trabajo, fue el desarrollo de hidrolizados proteicos utilizando un extracto crudo, elaborado a partir de la masa pancreática y de los ciegos pilóricos del atún aleta azul del Pacífico, para hidrolizar dos distintas fuentes proteicas. Con el fin de estandarizar la calidad de la materia prima a utilizar, se seleccionaron como fuentes proteicas o sustratos, harina de pescado (en vez de sardina fresca, el alimento natural de éste pez) y soya, debido a que es un candidato ideal para utilizar en dietas formuladas para peces, e intentando imitar de cierta forma el proceso digestivo de este organismo, para posteriormente realizar la caracterización de los péptidos obtenidos en cuanto a tamaño y perfil de AAs y contrastarlos con los péptidos conseguidos tras hidrolizar los mismos sustratos con la enzima comercial papaína.

Esta información contribuirá al conocimiento de las necesidades nutricionales, procesos fisiológicos y aprovechamiento de nutrientes del atún aleta azul del Pacífico. Así mismo, las pruebas realizadas en el laboratorio tratan de generar el

conocimiento necesario para el desarrollo y escalamiento industrial de hidrolizados proteicos en conjunto con la empresa Tecno Protein S. A. de C. V. (El Sauzal, Ensenada, B. C.).

2. ANTECEDENTES

2.1 Proteasas

El uso de enzimas proteolíticas, es una herramienta de suma importancia en la industria farmacéutica, química, textil y para la elaboración de detergentes, entre otras aplicaciones. Así mismo, las enzimas mayormente empleadas para la producción de alimentos, ingredientes o aditivos alimenticios son las proteasas, provenientes de una gran diversidad de organismos. De tal manera, que enzimas como bromelina, ficcina y papaína, son obtenidas a partir del látex de frutos o plantas, mientras que proteasas digestivas de origen animal como la tripsina, quimiotripsina y pepsina, fueron las primeras en emplearse en la industria alimenticia (Guadix *et al.*, 2000), sin contar con aquellas que han sido utilizados desde tiempos remotos como en la industria de quesos y bebidas alcohólicas (Kirk *et al.*, 2002).

En años recientes, la biotecnología de enzimas ha mostrado un auge en el uso de proteasas procedentes de bacterias y hongos (Guadix *et al.*, 2000), y gracias a la tecnología del ADN recombinante, la manipulación y clonación de ADN, se ha permitido la obtención de proteasas genéticamente modificadas para usos específicos. Incluso, algunas resultan de la mezcla de varias proteasas, buscando lograr una mayor y eficiente hidrólisis, con actividades en medios ambientes extremos como altas temperaturas o alcalinidad, y que además puedan ser producidas en grandes cantidades y en diferentes presentaciones, como polvos o líquido. De modo que un gran número de proteasas de uso alimenticio se

encuentran disponibles comercialmente, con el inconveniente de que pueden resultar costosas (Aspmo *et al.*, 2005).

Las endopeptidasas provenientes de bacterias y plantas brindan una mayor eficiencia hidrolítica, sin embargo, el hecho de que la enzima no discrimine para cortar en la cadena polipeptídica, conlleva a la generación de péptidos de cadena muy corta, carentes de propiedades funcionales y en ocasiones con repercusiones en la palatabilidad del producto final, al aumentar su amargor. Para evitar este tipo de problemas se utilizan proteasas como las digestivas de origen animal, que son más específicas (Guillaume *et al.*, 2001).

A diferencia de lo observado en organismos terrestres, y atribuido a su adaptación a diversas condiciones ambientales y a las variaciones genéticas, las proteasas digestivas de los peces se caracterizan por presentar una alta y eficiente actividad catalítica inclusive a bajas temperaturas y con baja estabilidad térmica (Simpson y Haard, 1987; Gildberg, 1992; Klomklao *et al.*, 2005). Por dichas propiedades, las proteasas digestivas son ampliamente utilizadas en diversos bioprocesos, tales como la elaboración de detergentes, el tratamiento de pieles y en la industria farmacéutica, y de manera importante, en la industria alimenticia (Haard, 1992; Kawai e Ikeda, 1972; Ooshiro, 1971), donde se han utilizado enzimas digestivas de pescado para hidrolizar distintas fuentes proteicas, como leche, huevo, gelatina, pescado, carne, cereales, entre otras (Simpson y Haard, 1987; Stefansson, 1988; Wray, 1988; Haard, 1990; Wasserman, 1990;).

2.2 Hidrolizados proteicos

El objetivo en la elaboración de hidrolizados proteicos, es la solubilización de la fuente proteica para incrementar su valor biológico y/o nutricional, con lo que se logra un producto con valor agregado y comercializable (Nilsang *et al.*, 2005). Tras la hidrólisis, las proteínas son reducidas a AAs y péptidos de distintos tamaños, por lo que las moléculas proteicas experimentan una disminución en su peso y cambios en sus propiedades moleculares, como el incremento de la carga, la exposición de grupos hidrofóbicos y el desenmascaramiento de cadenas laterales reactivas de algunos AAs (Caessens *et al.*, 1999a); características que le confieren importantes propiedades funcionales a los hidrolizados proteicos frente a la proteína original. Es así que la solubilidad, emulsión, formación de espuma y mejoras en el sabor, se engloban dentro de las propiedades funcionales tecnológicas que poseen los hidrolizados proteicos. Mientras que, las propiedades funcionales biológicas, pueden incluir propiedades nutricionales como digestibilidad, hipoalergenicidad y actividad antimicrobiana; y propiedades fisiológicas o bioactivas, que se atribuyen por mostrar inhibición de la enzima de angiotensina y actividad opioide (Van der Ven, 2002).

Para que estas características benéficas puedan estar presentes en un hidrolizado proteico, es indispensable el control y seguimiento del proceso de hidrólisis, y para ello el parámetro comúnmente utilizado es el denominado Grado de Hidrólisis (GH), el cual es un indicador del número de enlaces peptídicos hidrolizados (Adler-Nissen, 1986a) y puede ser evaluado mediante diferentes métodos:

Los métodos principalmente empleados para la evaluación del GH, se basan en: a) La determinación de grupos α -amino libres, b) La valoración del protón liberado tras la disociación de un enlace peptídico a pHs específicos y c) La determinación de nitrógeno soluble. Para la estimación de éste último los métodos más frecuentes son: el método de Kjeldahl (AOAC, 1995), la reacción de Biuret (Hung *et al.*, 1984) y la detección de péptidos por sus grupos aromáticos (Pelissier, 1994).

Así mismo, la caracterización de los péptidos obtenidos en cuanto a tamaño se refiere, es otro parámetro de interés a evaluar, ya que la distribución del peso molecular puede ser de utilidad para la predicción de la capacidad antigénica de un hidrolizado, y en contraste, problemas de alergenicidad han sido relacionados a la presencia de péptidos de alto peso molecular los cuales incluso, en ocasiones proporcionan un sabor amargo al hidrolizado (Otani *et al.*, 1990; Guadix *et al.*, 2000). Los métodos más efectivos y populares para conocer los tamaños de los péptidos obtenidos tras la hidrólisis, son la ultrafiltración, la electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y la cromatografía líquida de exclusión molecular (Guadix *et al.*, 2000).

Por otra parte, la hidrólisis de diferentes fuentes proteicas con enzimas exógenas y/o endógenas, genera la aparición de péptidos bioactivos o con actividad biológica, que se definen como fragmentos proteicos que tienen un impacto en la regulación metabólica, las funciones o condiciones corporales, promueven la salud y reducen el riesgo de enfermarse (Kitts y Weiler, 2003, Shahidi y Zhong, 2008). Entre los efectos reportados que pueden tener estos péptidos bioactivos en el

humano se encuentran: la actividad antihipertensiva, antioxidante, antitrombótica y hipercolesterolémica, en el sistema cardiovascular; la actividad antagonista o agonista opioide, en el sistema nervioso; de unión a minerales, antiapetito y antimicrobiano, en el sistema gastrointestinal; y citoimmunomodulatorio, inmunomodulatorio y antimicrobiano, en el sistema inmunológico (Korhonen y Pihlanto, 2006). Estas características hacen por demás interesante la generación y estudio de este tipo de péptidos. Los péptidos bioactivos pueden estar presentes en alimentos como componentes naturales o ser producidos después de la hidrólisis enzimática. (Wang *et al.*, 2008). Cabe resaltar que la mayoría de los péptidos con actividad biológica han sido obtenidos por hidrolizar la proteína con enzimas como tripsina, pepsina y quimiotripsina (Li *et al.*, 2010), pero también tras hidrolizar distintas fuentes proteicas con enzimas comerciales como la papaína, una cisteína proteasa aislada a partir del látex de la papaya (Wang *et al.*, 2007).

2.3 Hidrolizados proteicos de pescado

El emplear la proteína de pescado para hidrolizar, resulta atractivo porque se conserva el valor nutritivo y se consigue un producto con valor agregado, y altamente comercializable. La industria pesquera genera grandes volúmenes de subproductos, que generalmente son descartados o utilizados para ser procesados como harina de pescado (Sathivel *et al.*, 2003), frecuentemente de baja calidad, ya sea por su bajo contenido de proteína y/o alto de cenizas. Se ha reportado el uso de músculo o subproductos de diversas especies de pescado, para la elaboración de hidrolizados proteicos de pescado: sardina (*Sardina pilchardus*; Quaglia y Orban, 1987b), bacalao del Atlántico (*Gadus Morhua L.*;

Aspmo *et al.*, 2005), salmón del Atlántico (*Salmo salar* L.; Kristinsson y Rasco, 2000; Liaset *et al.*, 2002) capelin (*Mallotus villosus*; Shahidi *et al.*, 1995), entre otros.

En la región Noroeste de México, el procesamiento del atún aleta azul tiene capacidad de generar subproductos equivalentes al 40% del peso de los organismos, los cuales no son aprovechados, por lo que pueden emplearse también como fuente proteica, al igual que otras especies sin valor comercial.

Los hidrolizados proteicos de pescado se caracterizan por poseer una alta solubilidad (Quaglia y Orban, 1987a,b), buena capacidad emulsificante (Badal y Hiyoshi, 2001) y espumante (Shahidi *et al.*, 1995), propiedades que son de utilidad sobre todo de manera tecnológica.

El uso de este tipo de producto es muy diverso, se emplean como fuente de nitrógeno en dietas entéricas para niños y adultos enfermos (Lebenthal *et al.*, 1983), como ingrediente en medios de cultivo microbianos (Gildberg *et al.*, 1989), en la producción de fertilizantes (Suzuki, 1981; Diniz y Martin, 1996; Aspmo, 2005), para aumentar el valor nutritivo de alimentos con bajo contenido proteico y de manera muy extensa, en alimentación animal, donde se utilizan como agentes hipoalergénicos (Shahibi y Venugopal, 1994) y atrayentes (Strom y Raa, 1991).

Además, los hidrolizados proteicos de pescado tienen efectos benéficos como el incremento en la absorción, lo que hace que este tipo de productos sean altamente utilizados en la formulación de alimentos para larvas y juveniles de diversas especies de importancia acuícola tales como el salmón del Atlántico

(Berge y Storenbakken, 1996), la curvina europea (Kotzamanis *et al.*, 2007) y el camarón tigre *Panaeus monodon* (Aggawanti *et al.*, 1990).

2.4 Maricultura del atún aleta azul del Pacífico

La maricultura del atún aleta azul del Pacífico, en Ensenada, B. C. data de hace 15 años, la actividad genera una derrama económica importante en la región. El proceso de cultivo de este organismo, consta básicamente de: 1. Captura y transporte de juveniles silvestres a jaulas flotantes, 2. Alimentación y engorde, 3. Cosecha, y 4. Venta. Los organismos son alimentado principalmente con sardina del Pacífico fresca (*Sardinops sagax caerulea*), y se requieren 17 Kg de sardina para la producción de 1 Kg de este organismo (Zertuche-González *et al.*, 2008), lo que hace insostenible el cultivo de este organismo. Por esto la necesidad de estudiar los requerimientos nutricionales de *T. orientalis* con la búsqueda de fuentes proteicas alternativas, para contemplar el desarrollo de alimentos formulados que representen una opción para su alimentación. En estudios previos, Martínez-Montaña y colaboradores en 2010, estudiaron la absorción de AAs a través del intestino invertido, utilizando hidrolizados de harina de sardina, por ser el alimento natural y de harina de soya, para evaluar su posible uso como fuente alterna de proteína en la nutrición del atún aleta azul del Pacífico. Ese trabajo concluye que los AAs y/o péptidos al ser distintos dependiendo de la fuente proteica, son absorbidos de manera distinta.

2.5 Fisiología digestiva del atún aleta azul del Pacífico

El atún aleta azul del Pacífico es un pez pelágico y carnívoro que posee un intestino corto, por lo que seguramente presenta una digestión muy eficiente, es decir, una hidrólisis rápida con cortes específicos, de tal manera que los péptidos generados se hidrolicen rápidamente y puedan absorberse casi de inmediato. Para ello, *T. orientalis* cuenta con un estómago bien definido, para una digestión ácida por acción de la pepsina, y un páncreas embebido en una masa de ciegos pilóricos que presenta una alta actividad de proteasas alcalinas (Matus de la Parra *et al.*, 2007), la cual se muestra por el gran tamaño de la masa de ciegos pilóricos, correspondiendo al 1.8% del peso total del organismo (9 Kg, para un organismo con un peso de 500 Kg) (Stevens y McLeese, 1984). Estudios *in vitro* de absorción intestinal utilizando atún aleta azul del Pacífico, han demostrado que existe diferencia en la velocidad de absorción de diferentes fuentes de proteína (Martínez-Montaña *et al.*, 2010) sugiriendo que los péptidos obtenidos pudieran ser distintos en tamaño y composición, en donde los hidrolizados obtenidos con harina de soya presentan una menor absorción. Es por esto que surge la interrogante de si la menor absorción se debe a que la harina de soya no sea eficientemente hidrolizada, o bien, obedece a lo anteriormente descrito para la soya, a una respuesta inmunológica que al ocasionar un proceso inflamatorio los enterocitos pierdan su capacidad de absorción.

El objetivo central de la presente tesis, es el desarrollo de hidrolizados proteicos utilizando un extracto crudo elaborado a partir de la masa pancreática conteniendo los ciegos pilóricos del atún aleta azul del Pacífico, para hidrolizar dos distintas

fuentes proteicas (harina de pescado y de soya), intentando imitar de cierta forma el proceso digestivo del atún, para la posterior caracterización de los péptidos obtenidos en cuanto a tamaño y perfil de AAs. Además, de contrastarlos con los péptidos conseguidos tras hidrolizar los mismos sustratos con la enzima comercial papaína.

3. HIPÓTESIS

Si las enzimas digestivas del atún están adaptadas para realizar una hidrólisis específica en la proteína que ingieren como alimento para favorecer una absorción eficiente, entonces los péptidos obtenidos utilizando harina de soya y otras enzimas comerciales de origen vegetal como la papaína, darán lugar a productos de hidrólisis distintos.

4. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Caracterizar los péptidos obtenidos de la hidrólisis de harina de pescado y de soya, utilizando un extracto enzimático crudo de páncreas del atún aleta azul del Pacífico (*Thunnus orientalis*) y con la proteasa comercial papaína.

3.2 Objetivos particulares

1. Obtener un extracto crudo de páncreas, a partir de subproductos del procesamiento del atún aleta azul del Pacífico.
2. Determinar la actividad específica y total de las proteasas alcalinas totales del extracto crudo pancreático y de la proteasa comercial papaína.
3. Desarrollar industrialmente un hidrolizado proteico de sardina con enzimas presentes en subproductos del atún aleta azul, en conjunto con la empresa Tecno Protein S. A. de C. V.
4. Hidrolizar harina de pescado y soya con el extracto crudo de páncreas y con la proteasa comercial papaína.
5. Comparar el perfil de los péptidos obtenidos tras la hidrólisis con el extracto crudo de páncreas de atún *T. orientalis*, con los obtenidos con la enzima comercial papaína.

5. METODOLOGÍA

La fase inicial consistió en el estudio de la actividad enzimática de las proteasas alcalinas totales presentes en un extracto crudo obtenido con ciegos pilóricos y páncreas de atún aleta azul del Pacífico, el cual sirvió de referencia para el desarrollo y escalamiento industrial de hidrolizados proteicos en conjunto con la empresa Tecno Protein S. A. de C. V., y a la par, en nuestro laboratorio hidrolizar dos diferentes fuentes proteicas (harinas de pescado y soya) con el extracto crudo y con una enzima comercial, para hacer un estudio comparativo que nos lleve a optimizar y hacer eficiente el proceso industrial. En ambos casos, se buscó caracterizar el tamaño y composición de los péptidos resultantes de la hidrólisis. El diagrama de flujo de la figura 1 muestra el panorama general de la metodología de este trabajo.

5.1 Obtención del extracto crudo pancreático

Las vísceras de atún aleta azul del Pacífico fueron obtenidas del rancho atunero Maricultura del Norte, S. A. de C. V., ubicado en la ciudad de Ensenada, B. C. Los subproductos se trasladaron en cama de hielo al laboratorio y los páncreas separados y almacenados a -80 °C hasta su uso. Para la obtención del extracto crudo, 300 g de segmentos de páncreas provenientes de cinco organismos, se homogeneizaron con una solución fría de NaCl al 10% en una relación 1:2 (páncreas/solución salina), con una trituradora manual (BRAUN®). Posteriormente la mezcla se centrifugó a 10,000 g (Multifuge 1-S-R, HERAEUS®) durante 30 min

a 4 °C y se recuperó el sobrenadante, el cual fue considerado el extracto crudo de páncreas.

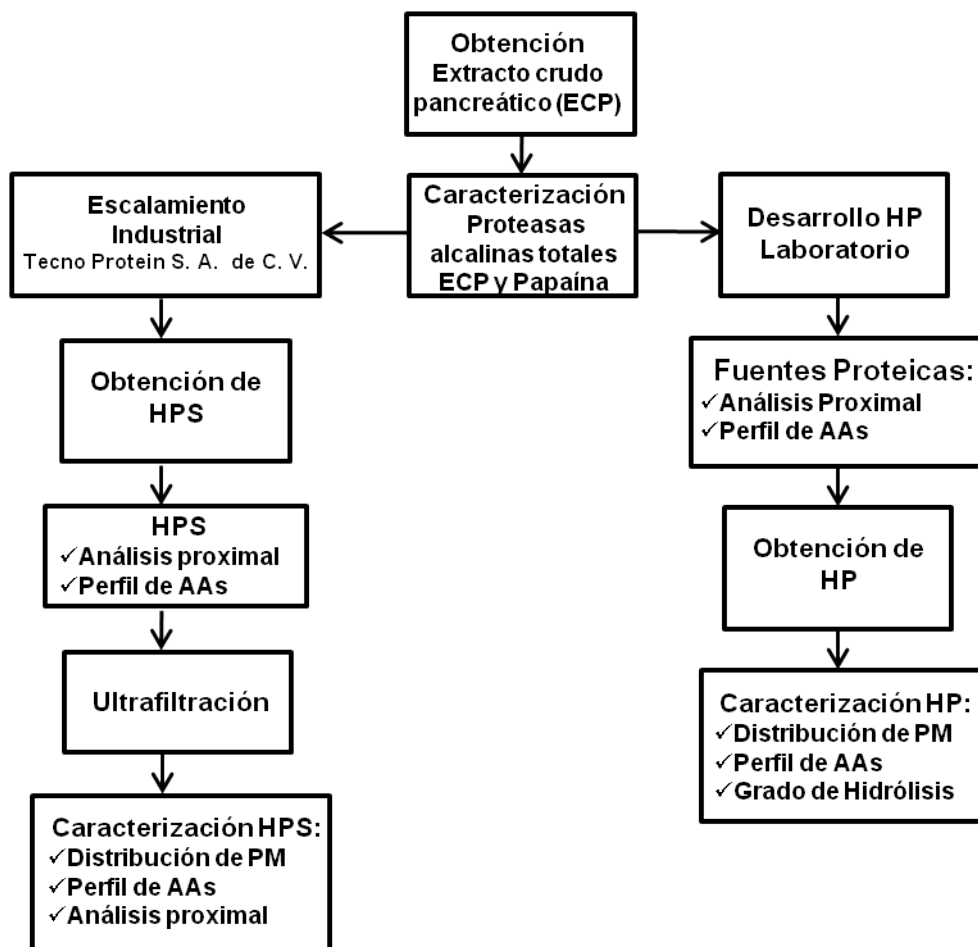


Figura 1. Diagrama de flujo que muestra el esquema general de la metodología del trabajo. ECP = Extracto Crudo de Páncreas; HP = Hidrolizado proteico; HPS = Hidrolizado proteico de sardina; PM = Peso molecular.

5.2 Ensayos de actividad enzimática

Para determinar la actividad enzimática de las proteasas alcalinas totales presentes en el extracto crudo de páncreas de atún y de la enzima comercial

papaína (látex crudo 102566, MP BIOMEDICALS LLC®) se utilizó el protocolo de Sarath *et al.* (1989), con modificaciones. La mezcla de reacción en todos los casos consistió en 200 µL del amortiguador Tris-HCl 50 mM, CaCl 10 mM con un pH a 8.1, 50 µL de una dilución enzima/agua y 75 µL de azocaseína al 2% (A-2765, SIGMA®) como sustrato. Para la reacción, la mezcla se incubó a 37 °C durante 20 min y se detuvo la reacción con 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 10% e incubando a 4 °C por 30 min. Finalmente se centrifugó a 13,500 rpm (Galaxy 14D, ®VWR) durante 5 min, para la recuperación del sobrenadante, en donde se monitoreó la producción del grupo azo por el incremento de la absorbencia a 360 nm en un espectrofotómetro marca ESPECTRONIC®. La actividad se reporta como porcentaje de actividad relativa (actividad máxima 100%).

El efecto de la temperatura sobre la actividad de las proteasas alcalinas totales presentes en el extracto pancreático de atún y de la papaína fue evaluado al someter las reacciones a nueve temperaturas diferentes: 4, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 y 65 °C, mientras que el efecto del pH fue determinado con el uso de diferentes amortiguadores con pH de: 3, 5, 7, 8, 9 y 10.

Para conocer el porcentaje de actividad para los principales grupos de enzimas del extracto crudo de páncreas de atún aleta azul, se utilizaron inhibidores específicos y se midió la actividad residual de las proteasas alcalinas totales. Para inhibición de la tripsina se utilizó el inhibidor de soya tipo II (T9128-5G SIGMA®), el cual se preparó a una concentración de 10 mg/mL disuelto con buffer de fosfatos pH 8. Para inhibir la quimiotripsina se utilizó TPCK (acrónimo en inglés de N α -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (T-1426, SIGMA®) preparado a una concentración de

10 mg/mL, disuelto en DMSO. En las mezclas de reacción se adicionaron 50 µL de los inhibidores. Se expresó el porcentaje de inhibición como la pérdida de actividad con respecto a un control de actividad sin inhibidores (100% de actividad).

Para conocer la estabilidad del extracto enzimático, este se incubó a diferentes temperaturas (4, 24, 37 y 60 °C) durante distintos tiempos, 1, 2 y 3 hr. Pasada esta incubación, se procedió a medir la actividad de las proteasas alcalinas totales mediante el protocolo de Sarath *et al.* (1989), con modificaciones, para determinar la actividad residual relativa al máximo obtenido.

5.2.1 Definición de las unidades de actividad total y específica:

La actividad fue expresada como actividad total (unidades totales de enzima presentes) y actividad específica (unidades de enzima por mg de proteína total, U/mg), utilizando las ecuaciones descritas a continuación:

Actividad total:

$$\text{U/mL} = \frac{\text{Absorbencia}_{(360\text{nm})} \times \text{volumen final (mL)}}{0.1 \times \text{tiempo (min)} \times \text{volumen extracto (mL)}}$$

Actividad específica:

$$\text{U/mg proteína soluble} = \frac{\text{Unidades de actividad total}}{\text{mg proteína soluble/ mL}}$$

5.2.2 Cuantificación de proteína soluble

La proteína soluble fue cuantificada con la técnica de Bradford (1976). Para ello, la reacción consistió en 5 µL de una dilución conocida del extracto crudo de páncreas o de la papaína, se agregaron 200 µL de reactivo Bradford (Quick

Start™ BIO-RAD; Hércules, CA) y 785 µL de agua. Tras un periodo de incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, se registró la absorbencia de la mezcla de reacción a 595 nm. Se empleó agua destilada en lugar de la dilución proteica como blanco. La concentración de proteína soluble se calculó ajustando la absorbencia corregida, a una ecuación realizada a partir de una recta de calibración (Anexo I), en la que se emplearon diferentes diluciones de una solución estándar de albúmina sérica de bovino (500-0007, BIO-RAD®), a partir de una concentración de 1.41 mg mL⁻¹.

5.3 Obtención de los hidrolizados proteicos

5.3.1 Hidrolizado proteico de sardina elaborado industrialmente

El hidrolizado proteico de sardina caracterizado en este trabajo, fue elaborado industrialmente por la empresa Tecno Protein S. A. de C. V. empleando sardina del Pacífico fresca, la cual fue previamente molida y desgrasada por centrifugación y como fuente de enzimas se utilizó las vísceras del atún aleta azul del Pacífico, considerando una relación de 10 a 0.5 (sardina: vísceras), la metodología empleada se detalla en la Figura 2.

5.3.2 Hidrolizados proteicos obtenidos en el laboratorio

Para el desarrollo de los hidrolizados proteicos en el laboratorio, como fuentes proteicas se utilizaron harina de pescado (LT Danesa, donada por Malta Clayton) y harina de soya (Nutrisoya, Alinsa), con 73.1 y 42.3% de proteína cruda respectivamente. Inicialmente las harinas fueron secadas en una estufa (THELCO®) a 60 °C durante 24 hrs y posteriormente colocadas en un desecador.

Se pesó por triplicado 2 g de proteína cruda seca de cada harina y se colocaron en matraces Erlenmeyer de vidrio de 250 mL. Se agregaron 100 mL de agua desionizada y se homogeneizó incubando la mezcla durante 15 min a 37 °C en baño María (PRECISION®) con agitación continua a 85 rpm.

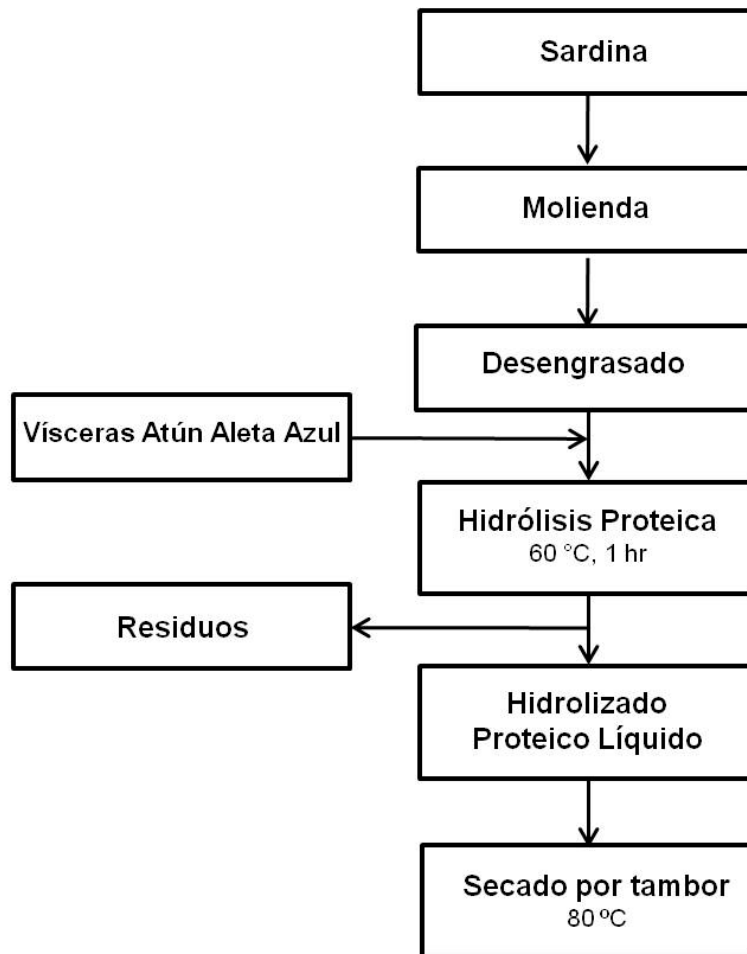


Figura 2. Diagrama de flujo que muestra la metodología para la elaboración industrial del hidrolizado proteico de sardina, caracterizado en este trabajo (Tecno Protein S. A. de C. V.)

En la figura 3 se muestran los procesos de obtención de los hidrolizados proteicos, utilizando el extracto crudo de páncreas y la enzima comercial papaína.

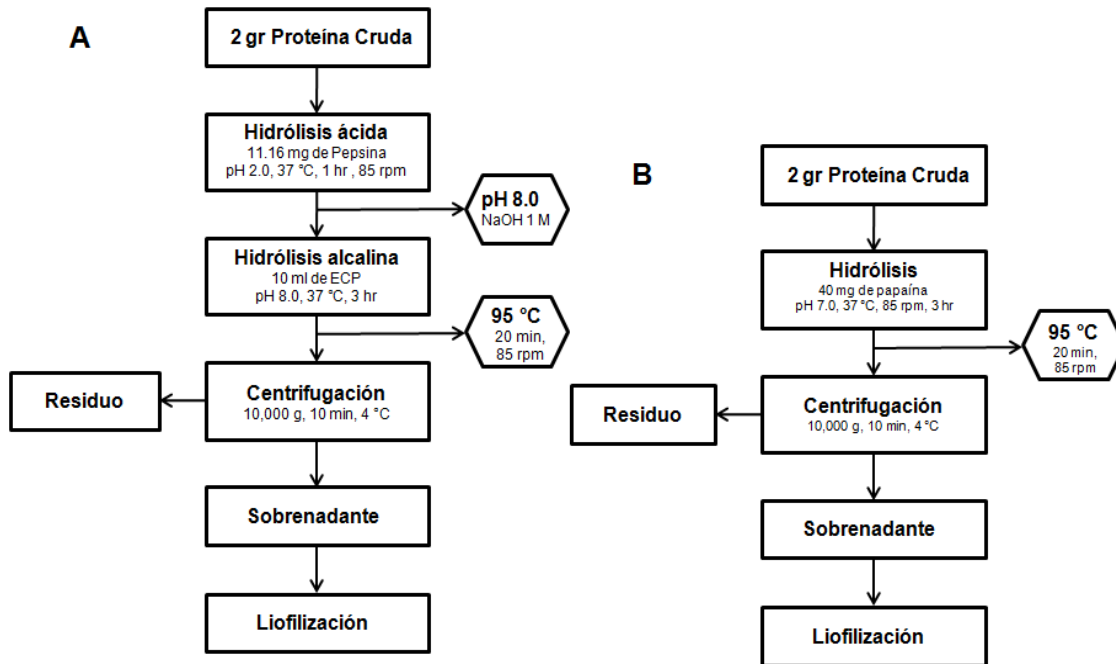


Figura 3. Diagramas de flujos que muestran los procesos de obtención de los hidrolizados proteicos en el laboratorio, utilizando el extracto crudo pancreático (A) y la proteasa comercial papaína (B).

Para hidrolizar con el extracto crudo de páncreas, tratando de imitar el proceso digestivo del atún aleta azul del Pacífico, inicialmente se realizó una hidrólisis ácida. Para ello, se ajustó el pH a 2.0 con HCl 12 N y se agregó 1 mL de pepsina porcina (P-7012, SIGMA®) a una concentración de 11.6 mg mL⁻¹, se homogeneizó la mezcla y se procedió a incubar la reacción a 37 °C por 1 hr, en agitación continua a 85 rpm, monitoreando que el pH se mantuviera en 2.0. Transcurrida la

hidrólisis ácida, se detuvo la reacción ajustando el pH a 8.0 con NaOH 1 M. Para iniciar la hidrólisis alcalina se agregaron 167 U del extracto crudo enzimático, se homogeneizó la mezcla y se procedió a incubar 37 °C en baño María, durante 3 hrs, con agitación continua a 85 rpm, manteniendo el pH a 8.0 con NaOH 1 M.

Los hidrolizados proteicos con papaína, fueron obtenidos ajustando el pH a 7, se agregaron 40 mg de la enzima, (látex crudo 102566, MP BIOMEDICALS LLC®), correspondiente al 2 %, relación enzima/sustrato según lo recomendado por Barbosa *et al.* (2004), se homogeneizó la mezcla y se incubó a 35 °C durante 3 hrs, en agitación continua a 85 rpm, manteniendo el pH en 7.

Finalmente, todas las soluciones hidrolizadas fueron centrifugadas a 10,000 g (BECKMAN COULTER®) durante 10 min, para obtener una fracción soluble (hidrolizado) que fue almacenada en bolsas de polietileno a -80 °C hasta ser liofilizadas (Virtis Freezemobile 12L; Gardiner, N. Y., USA). De igual forma, las fracciones insolubles fueron recuperadas en su totalidad y colocada en navetas de aluminio para ser secadas en estufa y cuantificar su peso. Cada hidrolizado se realizó por triplicado y con un blanco sin enzima.

5.4 Análisis proximales

Se realizó el análisis proximal de las harinas de pescado y de soya, utilizadas para la obtención de los hidrolizados proteicos en el laboratorio, así como del hidrolizado de sardina y de cada una de las fracciones ultrafiltradas. El contenido de proteína cruda se determinó con el método de micro Kjeldahl (AOAC, 1995), (factor de conversión de 6.25 al nitrógeno presente). La humedad se estimó

gravimétricamente por diferencia en peso entre la muestra inicial y la deshidratada a 100 °C por 24 horas a peso seco constante (AOAC, 1995). Los lípidos totales fueron cuantificados utilizando el método de Soxhlet empleando éter de petróleo como solvente acarreador (AOAC, 1995). Finalmente las cenizas se calcularon después de la ignición a una temperatura de 480 °C por 6 horas (AOAC, 1995). Todos los análisis fueron realizados por triplicado y se obtuvo un promedio.

5.5 Perfil de aminoácidos

Para el análisis de AAs, 25 mg de las muestras previamente desgrasadas y secas, fueron digeridas hasta AAs con 200 µL de una mezcla de HCl 6N con 0.06% de fenol en viales de vidrio de 1 mL, se incubaron por 24 hrs a 110 °C, para después proceder a filtrar las muestras con acrodiscos de 0.45 µm. Las muestras se derivatizaron con el kit comercial ACCQ*Tag (WATERS®). El perfil de AAs se evaluó en un equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés) marca WATERS®, se utilizó una columna de fase reversa (3.9 X 150 mm); AccQ*Tag C18 (WATERS®) con temperatura de 37 °C. Se empleó un volumen de inyección de 5 µL a una concentración de 25 mg/mL, para la corrida se utilizó un gradiente de buffer de boratos al 10% (WATERS®) acetonitrilo al 60%, a un flujo de 1mL/min. El sistema está acoplado a un detector de fluorescencia (WATERS® 474 series, Milford, MA, USA) en el cual se utilizaron longitudes de onda de 254/395 nm excitación/emisión para la detección de los AAs. La curva de calibración fue obtenida utilizando una solución de AAs estándares de 18.5 a 300 pmol. La integración de los datos obtenidos se realizó con el programa Empower Pro (WATERS®).

5.6 Grado de hidrólisis de los hidrolizados proteicos obtenidos en el laboratorio

El grado de hidrólisis fue expresado como el porcentaje de proteína cruda hidrolizada, y se estimó por la diferencia en el contenido de proteína cruda en la fracción insoluble del blanco (sin enzimas) y la muestra experimental. La proteína cruda se estimó como el contenido de N por el método de Kjeldahl utilizando el factor de 6.25.

5.7 Distribución de pesos moleculares de los péptidos constituyentes de los hidrolizados proteicos

5.7.1 Ultrafiltración del hidrolizado proteico de sardina

Para conocer la distribución de pesos moleculares de los péptidos presentes en el hidrolizado proteico de sardina elaborado industrialmente, se realizó el fraccionamiento en un sistema de ultrafiltración modelo DC 10L Hollow fiber Unit (AMICON®, Massachusetts, MA. USA), en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuernavaca, Morelos). Para cumplir con este objetivo, 1.145 kg del hidrolizado de sardina seco, se resuspendieron en 10 L de agua destilada y se procedió al ultrafiltrado con un flujo de 8 L/min, a una presión de 15 PSI y a temperatura ambiente (23°C) utilizando cartuchos de fibra hueca de corte molecular de 1µm, 100, 50, 10 y 3 kDa.

5.7.2 SE-HPLC

Se estimó la distribución de pesos moleculares de los péptidos de los hidrolizados obtenidos mediante exclusión molecular, acoplada a HPLC en un equipo marca

AGILENT® modelo 1100. Para ello, 10 mg de cada hidrolizado se disolvieron en 500 μ L de la fase móvil, consistente en solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.018 M, pH 7.0 NaCl 0.13 M, SDS al 2% y 20 μ L de la muestra disuelta fueron inyectados. Todas las muestras fueron corridas con la columna Zorbax Bio Series GF250 (AGILENT®). El flujo fue de 1 mL/min, de la fase móvil antes mencionado con flujo isocrático. La absorbencia se monitoreó a 254 nm con un detector de onda multiple (G1365B, AGILENT®) y el tiempo de corrida fue de 15 min

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización de las proteasas alcalinas totales presentes en el extracto crudo pancreático

6.1.1 Efecto de la temperatura

La actividad de las proteasas alcalinas totales presentes en el extracto crudo de páncreas, se incrementó conforme aumentó la temperatura (cuadro II), llegando al 100% de la actividad relativa a la temperatura de 65 °C (figura 4), patrón similar al observado por Matus de la Parra *et al.* (2007).

Cuadro II. Actividad específica (U/mg) de las proteasas alcalinas totales del extracto crudo pancreático a diferentes temperaturas.

Temperatura °C	Absorbencia 360 nm	Actividad total U/mL	Actividad específica U/mg prot	Desviación Estándar
4	0.10	2.11	0.19	0.28
15	0.17	3.51	0.31	0.62
20	0.21	4.43	0.39	0.41
25	0.33	7.08	0.63	0.18
30	0.44	9.44	0.84	2.70
35	0.73	15.56	1.38	1.64
40	0.87	18.45	1.64	0.26
50	1.41	30.05	2.67	3.49
65	1.45	30.78	2.74	2.03

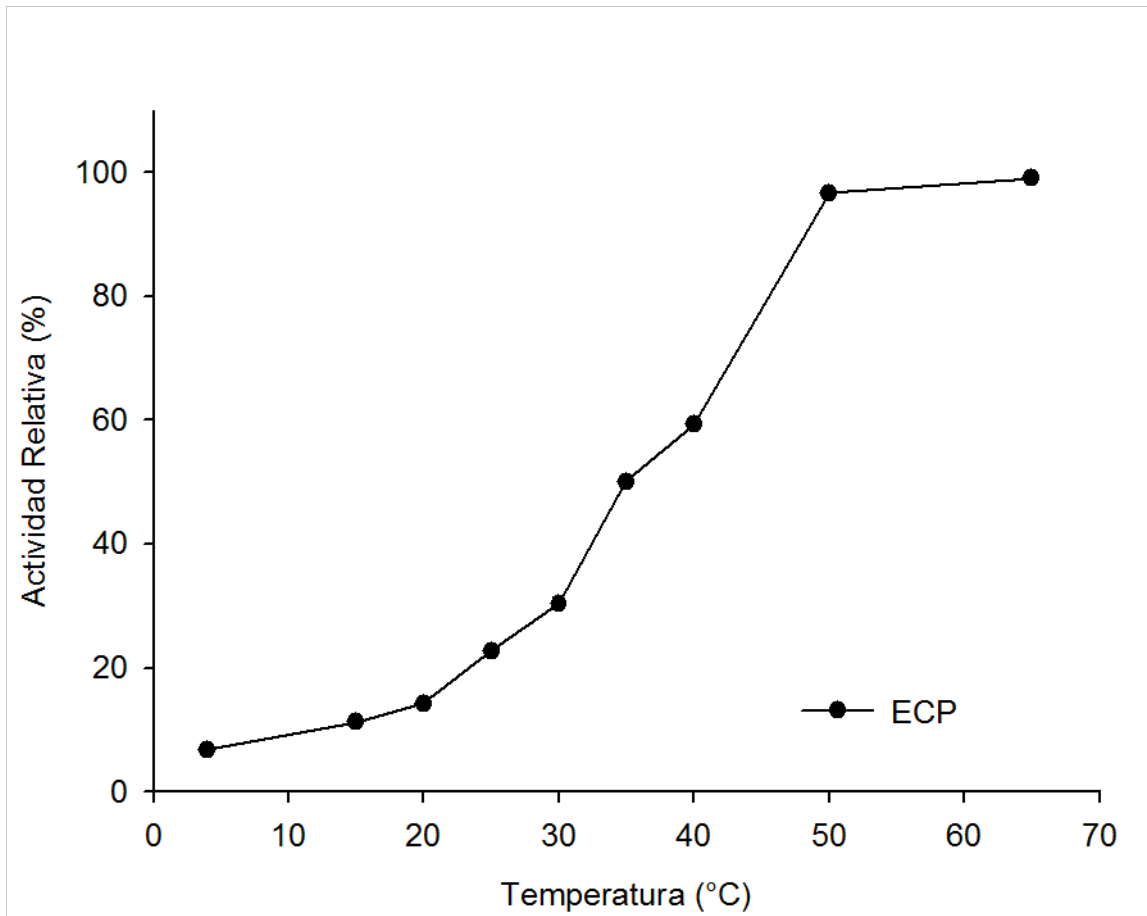


Figura 4. Porcentaje de actividad relativa máxima de las proteasas alcalinas totales presentes en el extracto crudo pancreático a diferentes temperaturas.

6.1.2 Efecto del pH

Como se muestra en el cuadro III y en la figura 5, la mayor actividad se observó a pH 9, mientras que a pH de 10 disminuyó la actividad de las proteasas alcalinas totales del extracto crudo pancreático.

Cuadro III. Actividad específica (U/mg) de las proteasas alcalinas totales del extracto crudo pancreático a diferentes pHs.

pH	Absorbancia 360 nm	Actividad total U/mL	Actividad específica U/mg prot	Desviación Estándar
3	0.07	0.18	2.07	2.46
5	0.17	0.48	5.42	2.76
7	0.54	1.50	16.90	1.13
8	0.60	1.67	18.83	4.49
9	0.65	1.81	20.34	2.55
10	0.60	1.66	18.63	5.15

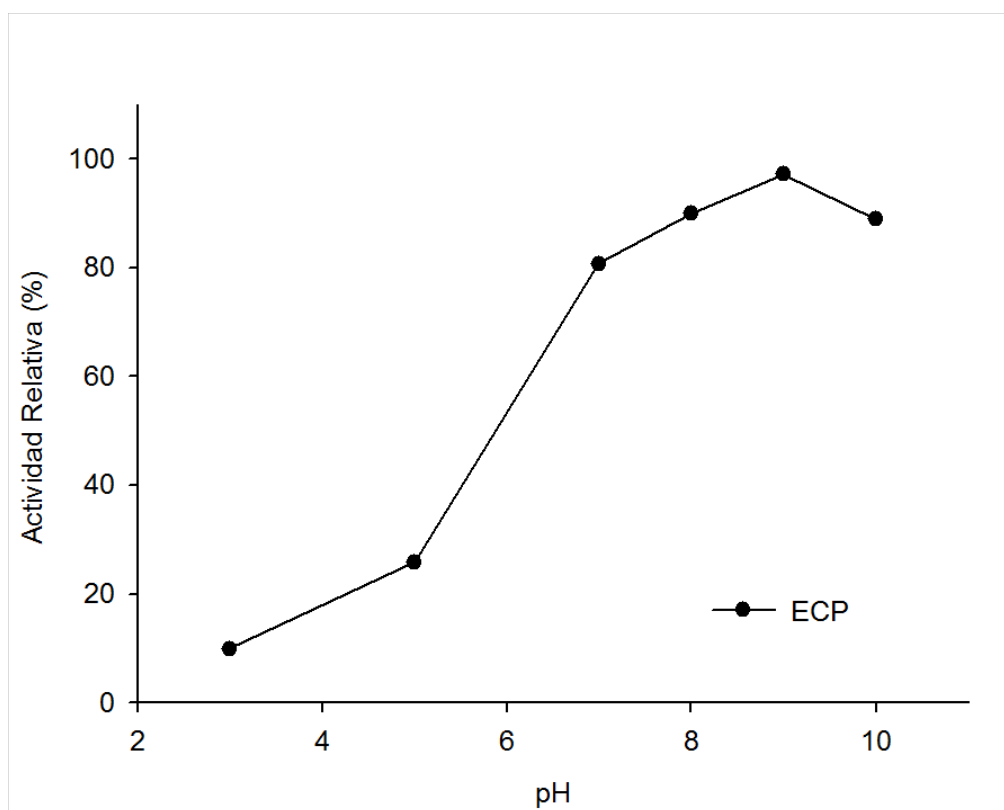


Figura 5. Porcentaje de actividad relativa máxima de las proteasas alcalinas totales presentes en el extracto crudo pancreático a diferentes pHs evaluado a 37 °C.

6.1.3 Participación relativa por grupo de enzimas

Al medir la actividad de las proteasas alcalinas totales del extracto crudo de páncreas, utilizando inhibidores específicos, para bloquear la actividad de la tripsina se utilizó ISII (inhibidor de soya tipo II) y TPCK (N α -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone) para quimiotripsina.

Se observó que el 89% de la actividad enzimática corresponde a enzimas tipo tripsinas, solo el 3% de la actividad se atribuye a quimiotripsina y la actividad residual que podemos relacionar al resto de las proteasas presentes en el extracto es solo del 8%. Estos resultados se muestran en el cuadro IV.

Cuadro IV. Actividad enzimática en porcentaje, por grupo de enzimas del extracto crudo pancreático, obtenido con el uso de inhibidores específicos.

Enzimas	Inhibidor	Promedio Absorbencia	Actividad enzimática	% de actividad enzimática
PAT		0.55 \pm 0.04		100
Tripsina	TPCK	0.06 \pm 0.00	11.13	89
Quimiotripsina	ISII	0.53 \pm 0.00	97.06	3
Actividad Residual				8

PAT: proteasas alcalinas totales.

TPCK: N α -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone

ISII: Inhibidor de soya tipo II

6.1.4 Estabilidad del extracto crudo de páncreas a diferentes temperaturas durante distintos tiempos

La actividad de las proteasas alcalinas totales del extracto crudo de páncreas sin incubación previa, representó el valor máximo para la estimación del porcentaje de actividad relativa, de los distintos tratamientos del extracto crudo de páncreas. Los resultados mostraron que la actividad se mantuvo luego de incubar el extracto a 4, 24 y 37 °C, durante los diferentes tiempos (1, 2 y 3 hrs). Mientras que el porcentaje de actividad fue muy bajo a partir de la primer hr de la incubación a 60 °C, cuadro V.

Cuadro V. Estudio de la actividad de las proteasas alcalinas totales en el extracto crudo pancreático por incubación a 4, 24, 37 y 60 °C durante 1, 2 y 3 hr. Después de la incubación la actividad fue evaluada a 37 °C según el protocolo de Sarath *et al.* (1989), con modificaciones.

Temperatura °C	% de actividad relativa			
	hrs de incubación			
	0	1	2	3
4		57.8	63.6	69.9
24		77.0	79.2	88.7
37	100	74.3	76.4	79.3
60		15.5	11.6	11.7

6.2 Caracterización de la actividad proteolítica de la enzima comercial papaína

6.2.1 Efecto de la temperatura

La actividad de la enzima papaína muestra un aumento conforme se incrementa la temperatura (cuadro VI), alcanzándose una actividad relativa máxima a 60 °C (figura 6), mismo comportamiento observado en el extracto crudo.

Cuadro VI. Actividad específica (U/mg) de la enzima comercial papaína a diferentes temperaturas.

Temperatura °C	Absorbencia 360 nm	Actividad total U/mL	Actividad específica U/mg prot	Desviación Estándar
4	0.10	1.01	0.84	0.37
15	0.18	1.85	1.53	1.09
20	0.17	1.75	1.45	0.40
25	0.27	2.82	2.33	1.07
30	0.47	4.89	4.03	0.79
35	0.48	5.05	4.16	1.26
40	0.67	6.93	5.72	3.69
50	1.15	12.02	9.92	1.89
65	1.20	12.47	10.29	2.00

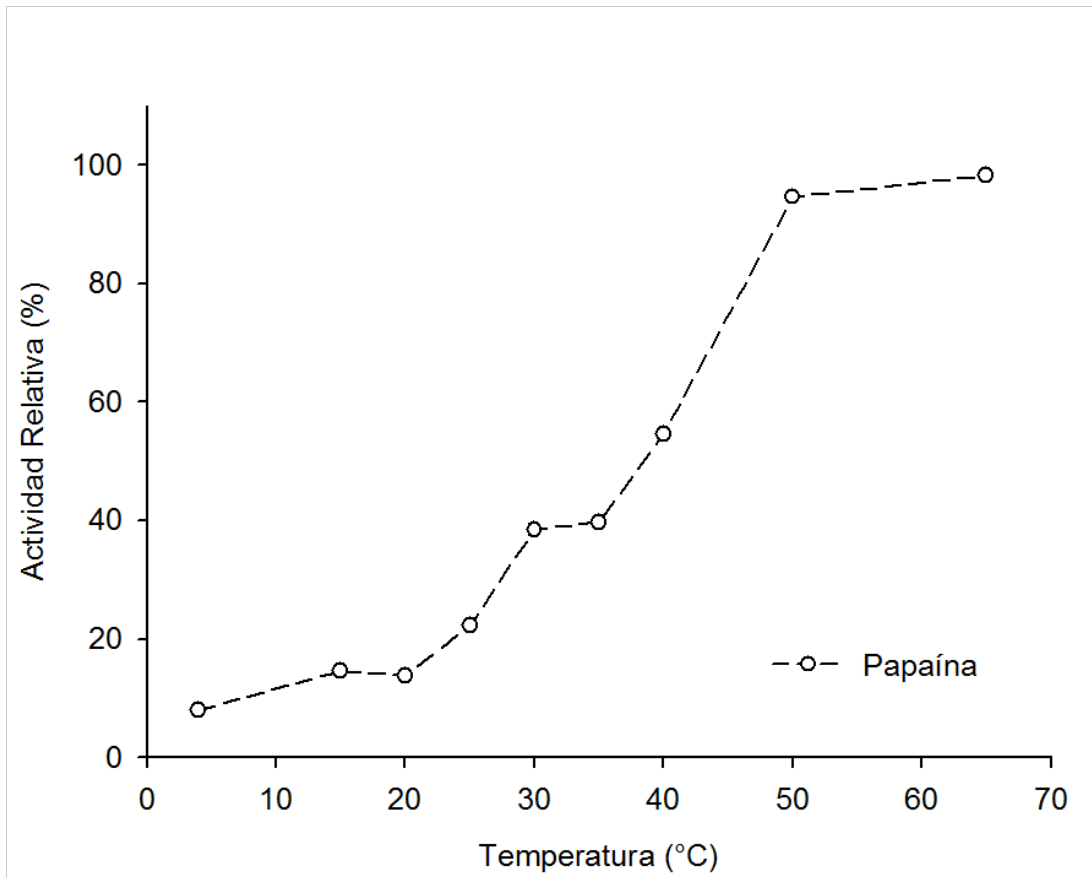


Figura 6. Porcentaje de actividad relativa máxima de la enzima comercial papaína a diferentes temperaturas.

6.2.2 Efecto del pH

La actividad óptima de la proteasa papaína se observó a un pH de 7 (cuadro VII), en la figura 7 se puede observar el % de actividad relativa máxima obtenida con los diferentes pH probados incubados a 37°C.

Cuadro VII. Actividad específica (U/mg) de la enzima comercial papaína a diferentes pHs, evaluado a 37 °C.

pH	Absorbancia 360 nm	Actividad total U/mL	Actividad específica U/mg prot	Desviación Estándar
3	0.15	1.59	1.31	4.84
5	0.57	5.89	4.86	0.23
7	0.84	8.77	7.24	3.43
8	0.74	7.69	6.34	3.45
9	0.67	7.00	5.78	1.63
10	0.65	6.75	5.57	1.87

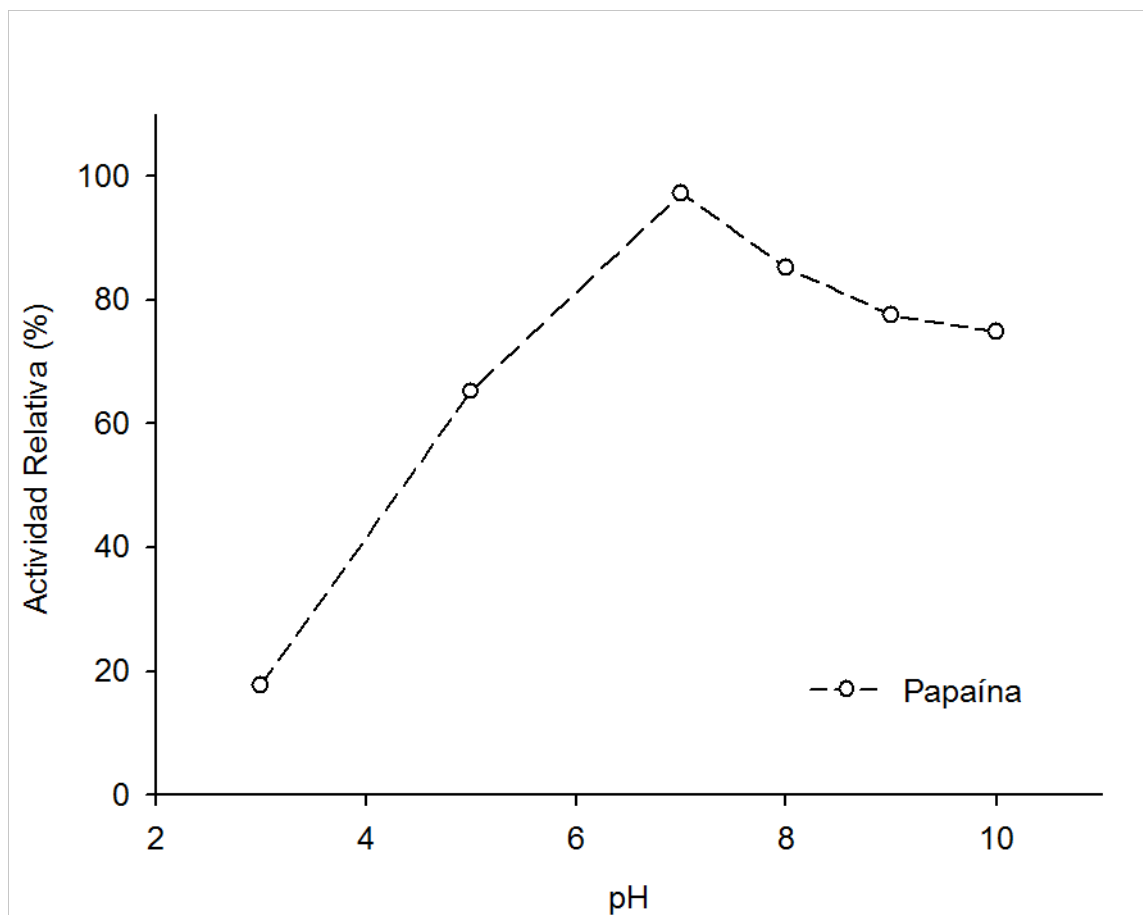


Figura 7. Porcentaje de actividad relativa máxima de la enzima comercial papaína a diferentes pHs, evaluado a 37 °C.

6.3 Caracterización química del hidrolizado proteico de sardina elaborado industrialmente

6.3.1 Composición proximal

La composición proximal del hidrolizado proteico de sardina elaborado a escala industrial por la empresa Tecno Protein S. A. de C. V. se muestra en la cuadro VIII.

Cuadro VIII. Composición proximal del hidrolizado proteico de sardina obtenido industrialmente.

Composición	%
Proteína	73.62
Lípidos	5.68
Ceniza	9.53
ELN	6.28
Humedad	4.89

6.3.2 Perfil de aminoácidos

El perfil de AAs del hidrolizado proteico de sardina, obtenido industrialmente se muestra en la cuadro IX.

Cuadro IX. Perfil de aminoácidos del hidrolizado proteico de sardina elaborado industrialmente (mg de AA/g de proteína).

Aminoácido	Hidrolizado de sardina
Asp	78.9
Ser	49.2
Glu	126.4
Gly	144.9
His	18.9
Tau	86.0
Arg	43.9
Thr	37.4
Ala	93.0
Pro	53.5
Tyr	15.2
Val	53.2
Met	23.2
Lys	44.1
Ile	42.4
Leu	62.4
Phe	27.4
Total	1000.00

6.3.3 Distribución de pesos moleculares de los péptidos

El peso en seco en gramos de las seis fracciones del hidrolizado de sardina obtenidas mediante ultrafiltración y el porcentaje que representa cada una de ellas se muestra en la figura 8.

6.3.4 Análisis proximal de las fracciones ultrafiltradas

En la cuadro X se muestra el % de peso seco, % de proteína cruda y el % de cenizas de las seis fracciones ultrafiltradas.

Cuadro X. Descripción del porcentaje en peso en seco (%PS) correspondiente al contenido de proteína cruda (%PC) y cenizas (%C), de las seis fracciones ultrafiltradas del hidrolizado de sardina.

Fracción	PS	PC %	C
Insolubles	67.0	49.1	9.0
0.1 μ m – 100 kDa	4.9	60.0	28.3
100 kDa – 50 kDa	2.1	56.7	29.9
50 kDa – 10 kDa	1.8	62.1	29.0
10 kDa – 3 kDa	1.3	62.0	24.0
< 3 kDa	23.0	62.2	29.0
Total	100		

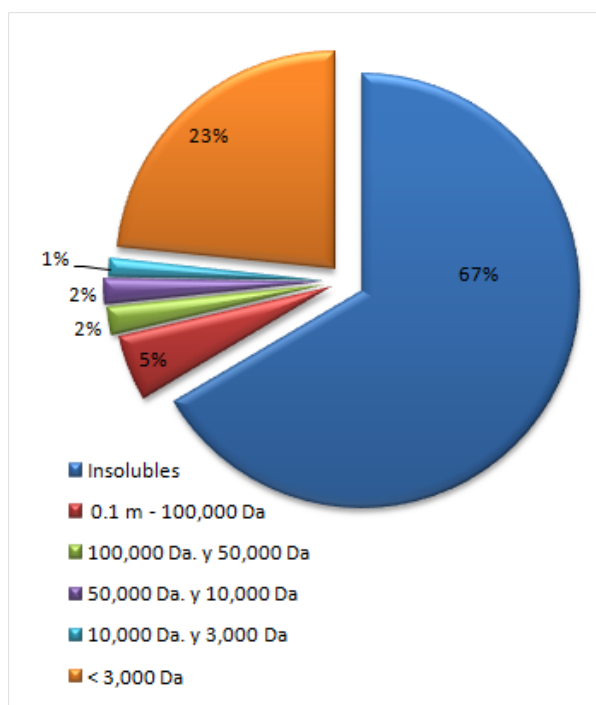


Figura 8. Porcentaje del peso seco de las seis fracciones ultrafiltradas del hidrolizado proteico de sardina.

6.3.5 Perfil de aminoácidos de las fracciones ultrafiltradas

La composición aminoacídica de cuatro de las seis fracciones obtenidas por ultrafiltración se muestra en la figura 9.

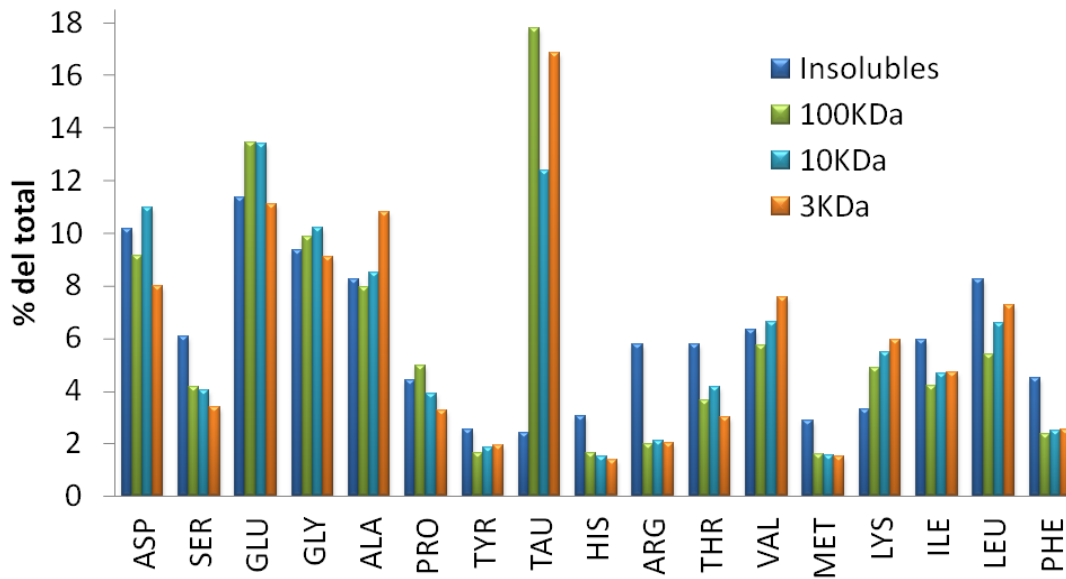


Figura 9. Perfil de aminoácidos para cuatro de las seis fracciones ultrafiltradas, del hidrolizado proteico de sardina.

6.4 Caracterización de los hidrolizados proteicos desarrollados en el laboratorio

6.4.1 Composición proximal y perfil de aminoácidos de las harinas empleadas como fuente proteica

La composición proximal de las harinas empleadas como sustrato en la obtención de los hidrolizados proteicos en el laboratorio y su perfil de AAs se muestra en los cuadros XI y XII respectivamente.

Cuadro XI. Composición proximal de las fuentes proteicas utilizadas para la obtener los hidrolizados en el laboratorio.

Harina	Proteína	Lípidos	Cenizas	Humedad
Pescado ¹	73.3	11.6	11.6	5.2
Soya ²	42	1.1	7.2	5.3

1 Harina de pescado (LT Danesa, donada por Malta Clayton)

2 Harina de soya (Nutrisoya, Alinsa)

Cuadro XII. Perfil de aminoácidos de la harina de pescado y de la harina de soya (mg de AA/g de proteína).

Aminoácido	H. Pescado	H. Soya
Asp	75.5	95.3
Ser	55.6	70.1
Glu	118.0	170.1
Gly	112.3	79.6
His	28.3	29.7
Tau	21.0	-
Arg	57.6	70.9
Thr	45.1	42.6
Ala	90.2	69.6
Pro	64.3	65.4
Tyr	19.0	20.1
Val	52.2	44.9
Met	27.8	12.8
Lys	85.2	77.6
Ile	41.0	41.9
Leu	73.8	71.1
Phe	33.0	38.2
Total	1000.00	1000.00

6.4.2 Contenido proteico de las fracciones solubles e insolubles de los hidrolizados

Para conocer el grado de hidrólisis se cuantificó la proteína cruda de las fracciones solubles e insolubles de los hidrolizados desarrollados, los resultados se muestran en el cuadro XIII.

Cuadro XIII. Cuadro de rendimiento de los hidrolizados obtenidos en el laboratorio con el extracto crudo pancreático de atún aleta azul del Pacífico y con la enzima comercial papaína, utilizando como fuentes proteicas de harina de pescado y soya.

Fuente proteica	Hidrolizado	Enzimas			Fracción Insoluble		
		Pepsina (U)	ECP (U)	Papaína (mg)	% Harina	% PC	% PC hidrolizada
Harina de pescado	Blanco	-	-	-	71.5	44.5	28.9
	HP/ECP	20,000	167	-	31.1	15.7	
	Blanco	-	-	-	68.8	83.7	21.5
	HP/P	-	-	40	55.0	62.2	
Harina de soya	Blanco				45.5	48.9	28.1
	HS/ECP	20,000	167	-	37.0	20.8	
	Blanco	-	-	-	49.4	67.5	34.5
	HS/P	-	-	40	34.5	33.0	

HP= Harina de pescado; HS= Harina de soya; ECP= Extracto Crudo Pancreático; PC= Proteína Cruda; U= Unidades;

*Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

El porcentaje de proteína cruda hidrolizada, se reporta como la diferencia entre la proteína cruda presente en el blanco (sin enzima) y la muestra experimental.

6.4.3 Distribución de pesos moleculares de las fracciones solubles de los hidrolizados

La distribución de los péptidos obtenidos al hidrolizar harina de pescado con el extracto crudo de páncreas y la comparación tras su hidrólisis con papaína se muestra en la figura 10. Al hidrolizar harina de pescado con el extracto enzimático, se observa una reducción en la fracción de péptidos mayores de 150,000 Da, y la aparición de péptidos de menores de 12,400 Da, fracción que no aparece cuando se hidroliza el mismo sustrato (harina de pescado) con papaína.

De igual manera, la figura 11 es un comparativo de los cromatogramas con la distribución del tamaño de los péptidos obtenidos tras hidrolizar harina de soya con el extracto crudo pancreático y papaína. Al hidrolizar harina de soya con papaína se observó la disminución de la fracción de mayor peso molecular, que se vio reducida a una fracción cercana a los 150,000 Da y dos más sobre ese rango de pesos moleculares.

La figura 12 corresponde a una comparación entre los cromatogramas obtenidos utilizando el extracto enzimático de páncreas para hidrolizar las dos distintas fuentes proteicas, y la figura 13 al hidrolizar con papaína.

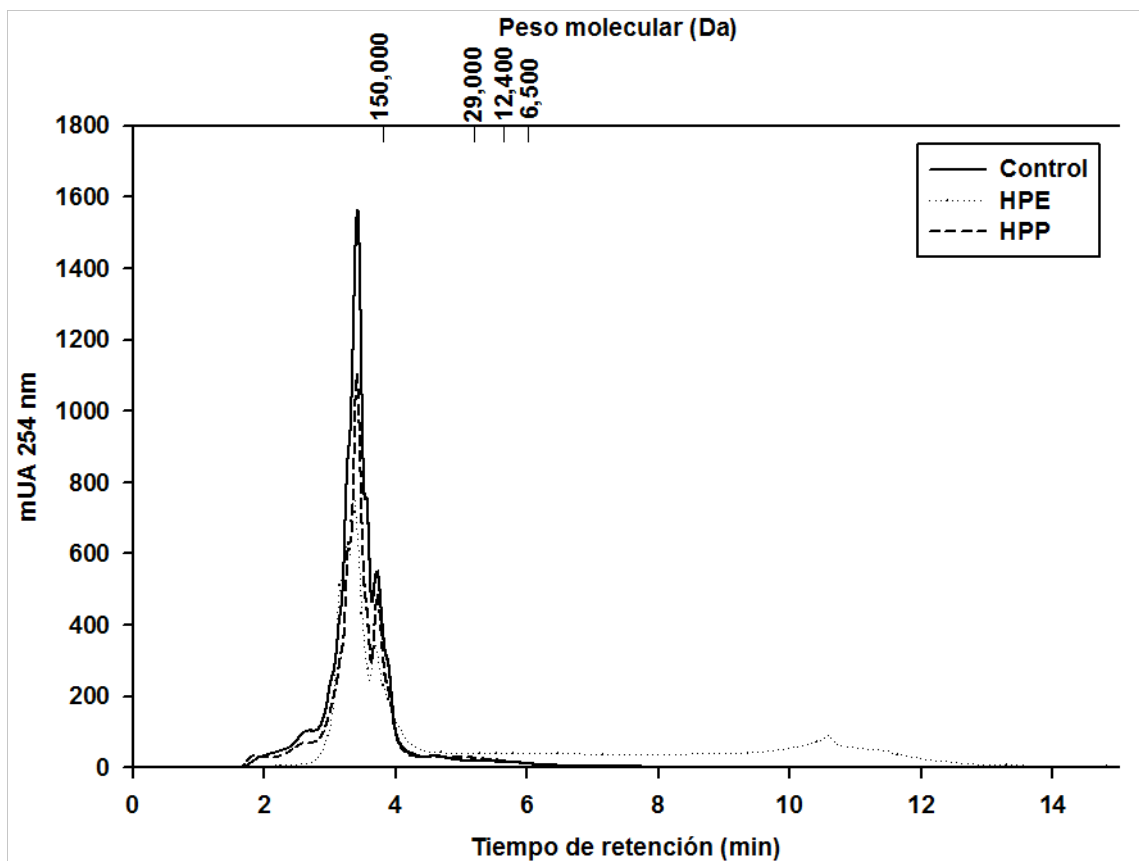


Figura 10. Cromatografía de exclusión molecular acoplada a HPLC utilizando la columna Zorbax Bio Series GF-250 (Agilent®). Los cromatogramas muestran la fracción soluble de los hidrolizados de harina de pescado (HP) de las reacciones empleando: extracto crudo pancreático (HPE), ---- papaína (HPP) y — del sustrato (Control). La señal exhibida fue monitoreada con UV a 254 nm, el tiempo de corrida de 15 min. Se inyectaron 20 μ L a una concentración de 5 mg/mL de muestra. En la parte superior de la figura se muestra una aproximación del peso molecular correspondiente al compuesto. (mAU = miliunidades de absorbencia).

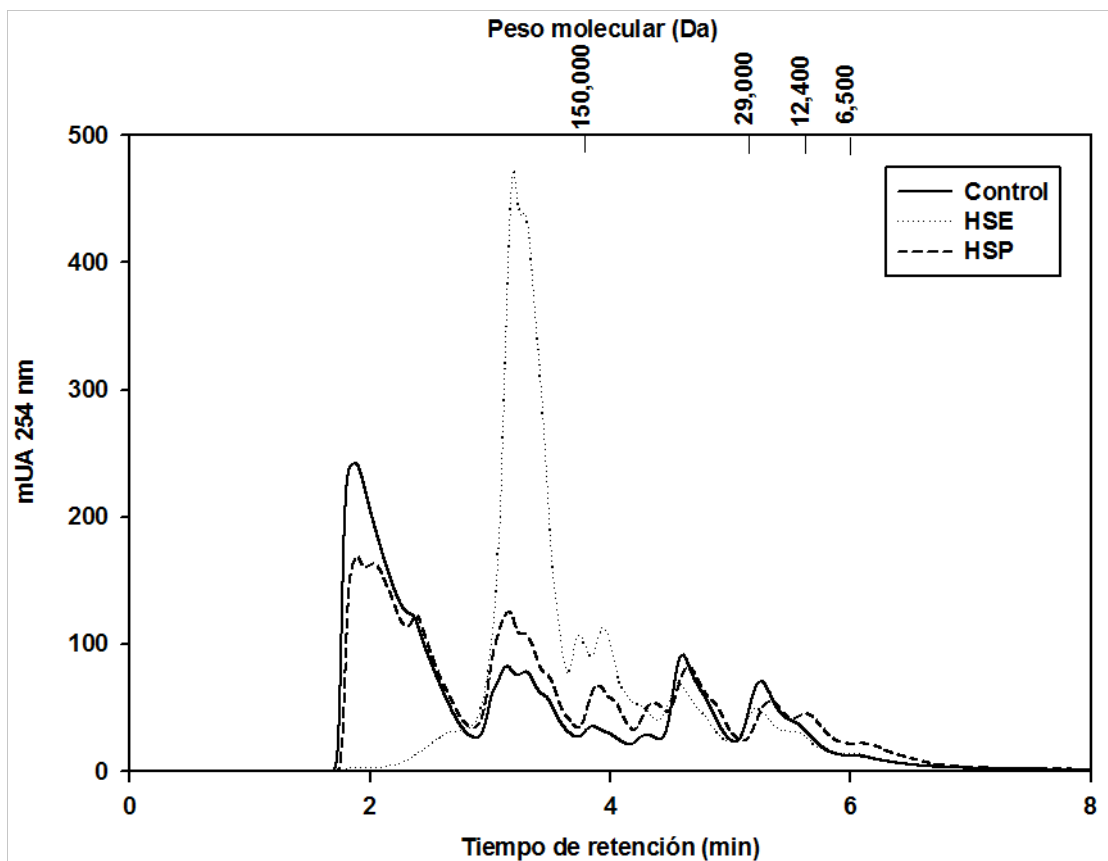


Figura 11. Cromatografía de exclusión molecular acoplada al HPLC utilizando la columna Zorbax Bio Series GF-250 (Agilent®). Los cromatogramas muestran la fracción soluble de los hidrolizados de harina de soya (HS) de las reacciones empleando: extracto crudo pancreático (HSE), ---- papaína (HSP) y — del sustrato (Control). La señal exhibida fue monitoreada con UV a 254 nm, y tiempo de corrida de 15 min. Se inyectaron 20 μ L a una concentración de 5 mg/mL de muestra. En la parte superior se muestra una aproximación del peso molecular correspondiente al compuesto. (mAU = miliunidades de absorbencia).

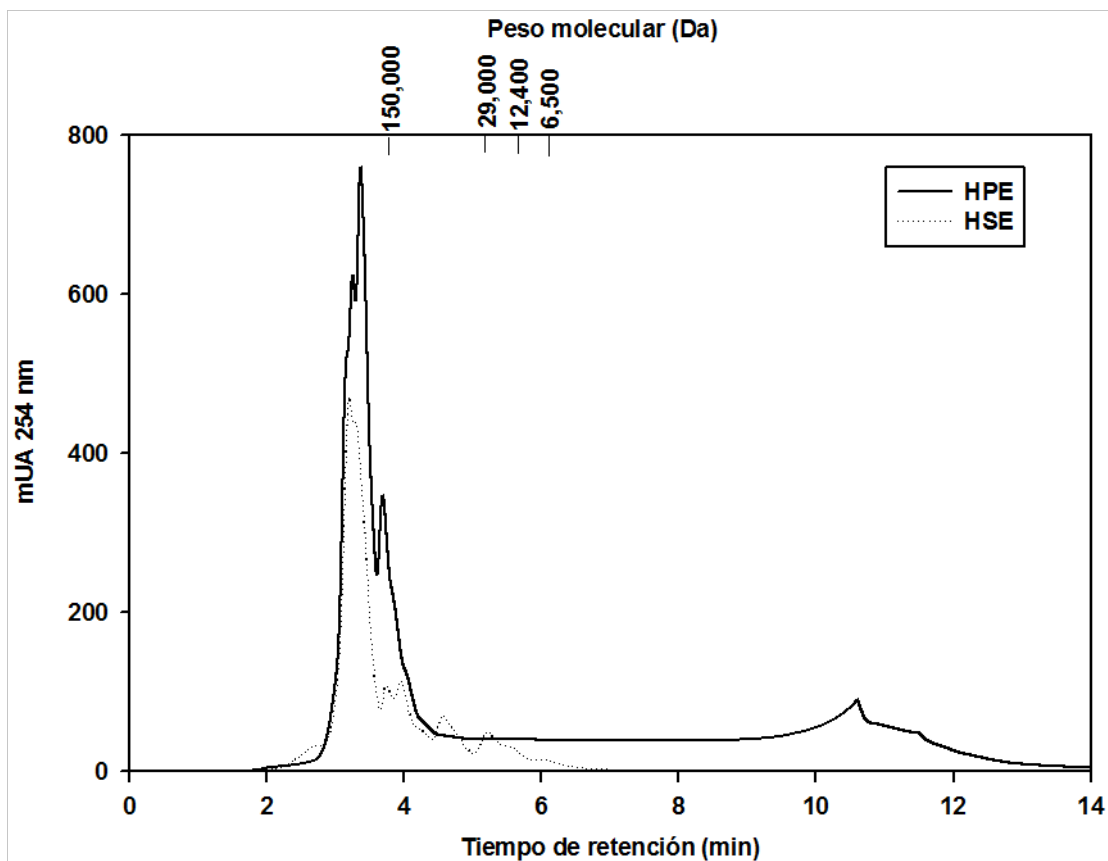


Figura 12. Cromatografía de exclusión molecular acoplada a HPLC utilizando la columna Zorbax Bio Series GF-250 (Agilent®). Los cromatogramas comparan la distribución del peso molecular de la fracción soluble de los hidrolizados obtenidos con el extracto crudo pancreático al emplear harina de pescado (HPE) — y harina de soya (HSE) como sustrato. La señal exhibida fue monitoreada con UV a 254 nm, el tiempo de corrida de 15 min. Se inyectaron 20 μ L a una concentración de 5 mg/mL de muestra. En la parte superior de la figura se muestra una aproximación del peso molecular correspondiente al compuesto. (mAU = miliunidades de absorbencia).

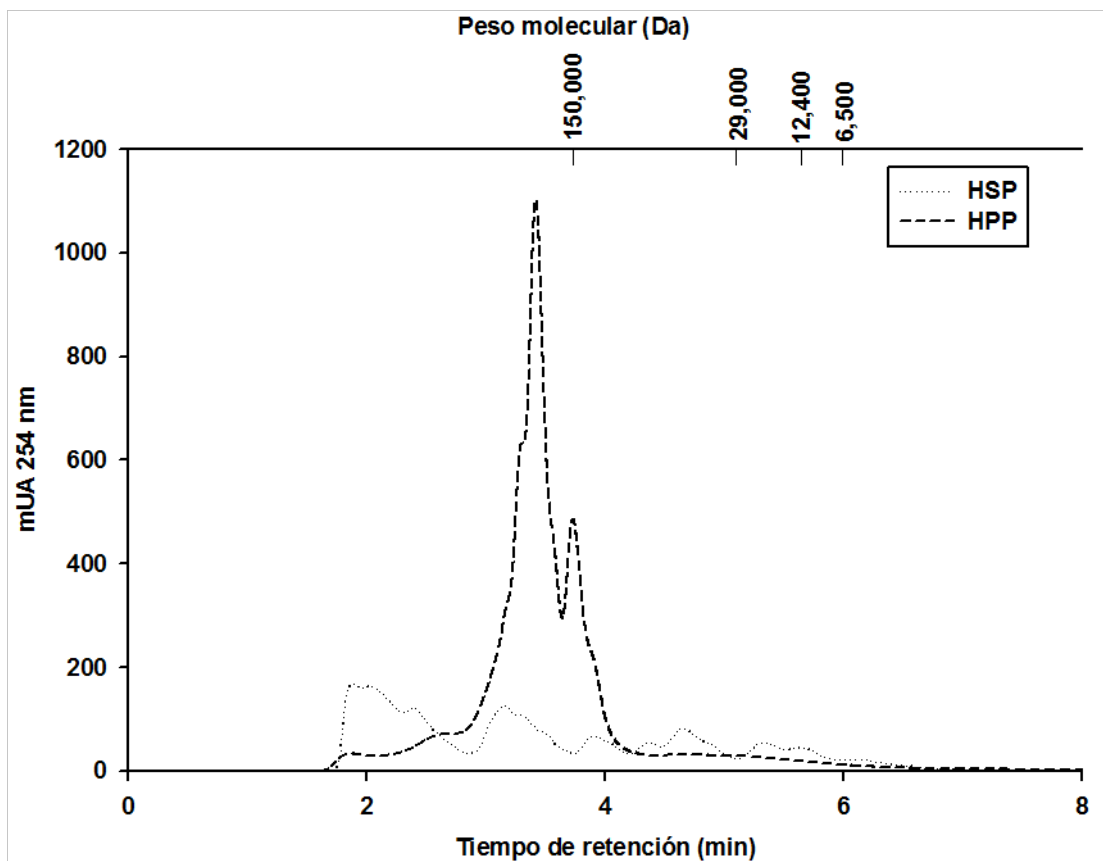


Figura 13. Cromatografía de exclusión molecular acoplada a HPLC utilizando la columna Zorbax Bio Series GF-250 (Agilent®). Los cromatogramas comparan la distribución de pesos moleculares de la fracción soluble de los hidrolizados obtenidos con la enzima comercial papaína al emplear harina de pescado (HPP) y harina de soya (HSP) ---- como sustrato. La señal exhibida fue monitoreada con UV a 254 nm, el tiempo de corrida de 15 min. Se inyectaron 20 μ L a una concentración de 5 mg/mL de muestra. En la parte superior de la figura se muestra una aproximación del peso molecular correspondiente al compuesto. (mAU = miliunidades de absorbencia).

7. DISCUSION

7.1 Caracterización enzimática del extracto crudo pancreático y de la papaína

El estudio de las proteasas digestivas del atún aleta azul del Pacífico, permite conocer las características óptimas respecto a temperatura y pH, de tal manera que el proceso pueda hacerse más eficiente, tanto en la obtención de los hidrolizados en nuestro laboratorio, como para el escalamiento industrial. La actividad de las proteasas alcalinas totales presentes en el extracto crudo pancreático, aumentó conforme se incrementó la temperatura, y se obtuvo 100% de la actividad relativa a los 65 °C, aunque por los altos porcentajes de actividad, podemos inferir que el rango de temperaturas óptimas para la actividad de las proteasas alcalinas presentes en el extracto crudo de páncreas está en un intervalo de 50 a 65 °C. Con respecto al efecto del pH, la actividad máxima se exhibió en el intervalo de 7 a 9 de pH, mientras que a pH más ácidos (3-5) se dio una pérdida de actividad considerable, al igual que a pH 10. Estos resultados son similares a los reportados por Matus de la Parra *et al.* (2007), sin embargo el comportamiento es aun más parecido a lo que ellos observaron para tripsina y no para proteasas alcalinas totales. Lo anterior refleja un amplio margen de actividad para poder llevar a cabo el escalamiento del proceso por comprender temperaturas de 50 a 65°C y pH de 7 a 9.

El ensayo de inhibición de los diferentes grupos enzimáticos mostró que dentro de las proteasas del extracto enzimático de páncreas, la tripsina es el grupo que tiene

mayor participación hidrolítica, con un porcentaje de actividad relativa del 89%. El utilizar inhibidores para conocer la participación relativa de los diferentes grupos enzimáticos, aporta información más certera que el uso de sustratos específicos para cada grupo enzimático. Es decir, las Unidades de actividad específica están dadas en los μ moles de desaparición del compuesto utilizado por unidad de tiempo; y si estos compuestos son de distinta naturaleza, entonces cada sustrato dará una cantidad distinta de Unidades de actividad específica por lo que resulta prácticamente imposible comparar las Unidades de actividad entre los distintos sustratos específicos. Lo anteriormente expuesto, aunado a que cada grupo enzimático muestra una afinidad distinta a cada sustrato específico, puede resultar en la estimación errónea de la actividad de determinado grupo de enzimas. Este es un punto que merece una mención especial, ya que es un problema común encontrado en la literatura reportada (Benyon y Bond, 2001). Por ejemplo, la tripsina se puede reportar utilizando sustratos específicos como BAPNA, BANA, TAME, etc. Dando lugar a que para la misma reacción se obtienen diferentes unidades de actividad.

Los estudios de estabilidad de las enzimas resultan importantes, sobre todo para generar las prácticas de manejo, tanto de laboratorio como a nivel industrial. Información que nos permite delinear una estrategia sobre los tiempos de reacción. Esto, debido a que en el proceso es necesaria la molienda de las vísceras de atún en un contenedor industrial (lo que representaría el extracto pancreático), en donde permanece durante un cierto tiempo, hasta que el sustrato esté molido y desengrasado y de esta manera pase al bioreactor para iniciar así el

proceso de hidrólisis. Los resultados aquí presentados señalan que, a partir de la primera hora de incubación del extracto crudo de páncreas a una temperatura de 60 °C, se disminuye dramáticamente el porcentaje de actividad de las proteasas alcalinas totales, posiblemente por la desnaturalización térmica de las mismas. La actividad de las proteasas alcalinas totales se mantuvo tras los distintos tiempos de incubación a 4, 24 y 37 °C, lo cual nos habla de una alta estabilidad de las enzimas digestivas hasta los 37°C. Sin embargo, la actividad a los 24 °C fue siempre más alta tras los diferentes tiempos de incubación, por lo que el uso de esta temperatura es la más recomendable para mantener el extracto enzimático durante el proceso y obtener un buen porcentaje de hidrólisis.

La enzima comercial papaína mostró un comportamiento similar al ser estudiada bajo las mismas condiciones que el extracto crudo pancreático en cuanto al efecto de la temperatura se refiere, de tal manera que se obtuvo mayor actividad a mayor temperatura, con un intervalo óptimo de 50 a 65 °C. Mientras que a un pH 7 se consiguió la mayor actividad, resultado que coincide con lo reportado por el productor en la hoja técnica (MP BIOMEDICALS LLC®). Y al igual que el extracto crudo de páncreas, la actividad de la papaína disminuye notablemente la actividad a bajos pHs. La papaína se caracteriza por presentar una estabilidad alta a temperaturas extremas y un amplio rango de pHs (MP BIOMEDICALS LLC®).

7.2 Caracterización del hidrolizado proteico de sardina elaborado industrialmente

El hidrolizado de sardina obtenido industrialmente presenta un alto porcentaje proteico, con 74% de proteína cruda. El porcentaje de cenizas fue de 9.5%, y cabe señalar que para este tipo de productos, Shativel *et al.* (2003) reportaron un contenido de cenizas de entre 9 a 22% dependiendo de la fuente proteica de pescado o subproducto se emplee; el hidrolizado de sardina tuvo un bajo contenido de lípidos (5.7%) lo que se atribuye al proceso de desengrasado que lleva el proceso a través de una centrífuga industrial (pág. 34) posterior a la molienda de la sardina. El producto se secó utilizando un secador de tambor a 80 °C, lo que pudo ocasionar una alta cantidad de material insoluble como se observó en las fracciones obtenidas en la ultrafiltración.

El perfil de aminoácidos (AAs) del hidrolizado de sardina completo demuestra que los AAs esenciales están presentes en una proporción similar, al perfil de AAs observado en la harina de pescado empleada para el desarrollo de los hidrolizados proteicos en nuestro laboratorio procedente de un lote de alta calidad de harina danesa (tipo LT por sus siglas en inglés de “low temperature”).

Respecto a la distribución del tamaño de los péptidos después de la ultrafiltración, dos fracciones fueron las más abundantes: la fracción insoluble y la de péptidos < 3 KDa (Cuadro X). La elevada concentración de insolubles en el hidrolizado de sardina puede ser el resultado de las partículas de tejido con grasa, que aunque hubo una importante reducción de la misma, su eliminación completa resulta difícil. Por otro lado, se sabe que la hidrólisis total a partir de pescado fresco es difícil y

siempre quedan fibras musculares o de tejido conectivo difíciles de hidrolizar. Además, el secado con tambor a 80 °C puede traer como consecuencia el sobrecalentamiento de proteína lo cual resulta en la asociación de proteína tipo colágeno con la gelatinización de la misma y consecuente aglomeración, algo similar a lo que ocurre en el procesamiento de harina de pescado con el secado directo. Sobre este punto, surge la necesidad de investigar más a fondo la conveniencia de este proceso de secado comparando con el costo beneficio de terminar con un producto semilíquido obtenido con la evaporación previa al secado. El obtener un producto seco resulta atractivo para su venta al facilitar su transporte y almacenamiento a corto plazo, sobre todo cuando hay que desplazar el producto por distancias largas, como sería necesario en México. Por ejemplo, si este producto se desarrolla en Ensenada Baja California en donde se encuentra el principal puerto pesquero en el Estado, mientras que el centro productor de alimentos formulados esta en Ciudad Obregón, Sonora, es necesario recorrer una amplia distancia para que el producto llegue a su destino. Sin embargo, habrá que comparar la calidad de péptidos y eficiencia en la hidrólisis, así como la calidad de los mismos utilizando el producto semilíquido antes del proceso de secado y hacer una evaluación de costo beneficio para llegar a una conclusión. En el producto como tal, la fracción < 3 KDa tiene una gran cantidad de productos hidrolizados como consecuencia de la alta actividad hidrolítica de las proteasas presentes en las vísceras de *T. orientalis*.

Los perfiles de AAs de las fracciones ultrafiltradas (Figura 9) muestran una alta concentración de Taurina (Tau) en todas las fracciones solubles. La Tau es una

aminoácido que se encuentra en todos los tejidos animales y no forma parte de la proteína estructural por lo que siempre está en forma libre y se involucra en importantes procesos fisiológicos tales como: osmoregulación, respuesta antioxidante, estabilización de la membrana, desintoxicación, y funciones renales y cardiacas (Huxtable, 1992). Es importante enfatizar que en estudios previos realizados a este tipo de productos no se reporta el contenido de Tau no porque no apareciera sino más bien por la ausencia de este aminoácido en los estándares de identificación, así como por falta de conocimiento sobre la importancia fisiológica de Tau.

Por otro lado, en el perfil de AAs (Figura 9) de las distintas fracciones ultrafiltradas se observa que la concentración de la Lys incrementa conforme disminuye el tamaño de las fracciones. Lo que probablemente está asociado al aporte significativamente mayor de la tripsina en el total de las de enzimas digestivas, enzima que hidroliza selectivamente sobre las posiciones del carboxilo de residuos Arginina o Lys en la cadena polipeptídica. Resultado interesante, dado que Lys es considerado el primer aminoácido limitante (Robinson *et al.*, 1980b) en peces y en la formulación de dietas para estos debe estar presente en un 4 al 6%.

El contenido de proteína cruda fue más bajo en la fracción insoluble con 49 % respectivamente, mientras que para el resto de las fracciones, el porcentaje de proteína cruda osciló entre 56.7 y 62.2%. Cabe resaltar que este último valor corresponde a la fracción de péptidos menores a 3 KDa. El contenido de cenizas si fue elevado para todas las fracciones, fue alto, con valores de entre 29.9 a 24%, a excepción de la fracción de insolubles en donde solo de 9% correspondió a

cenizas. El hecho de que cualquiera de las fracciones haya presentado menor cantidad relativa de proteína que la muestra completa, se debe probablemente a que el hidrolizado completo presentaba nitrógeno amoniacal, quizás por alteración desaminativa asociada a actividad bacteriana, que fue cuantificado inicialmente como proteína cruda, y que pudo ser disuelto y removido durante la ultrafiltración.

7.3 Caracterización de los hidrolizados proteicos desarrollados en el laboratorio

El haber utilizado estas dos fuentes de proteína tan distintas como lo son la harina de pescado y la de soya para hidrolizar con las enzimas digestivas del atún aleta azul, resulta por demás interesante para quien se dedica a la búsqueda de proteína alternativa a la harina de pescado en nutrición animal. Por una parte, al hidrolizar la harina de pescado que por su alto contenido proteico y composición aminoacídica, resulta similar al alimento natural del atún aleta azul, de tal forma que los péptidos obtenidos, son de alguna manera los que se deben de obtener durante el proceso de digestión natural para darnos una idea, no sólo de la cantidad de cortes, sino también sobre el perfil de AAs de cada uno de los cortes que podrán posteriormente ser absorbidos. Mientras que al utilizar la harina de soya para hidrolizar con las enzimas digestivas del *T. orientalis*, se hace una comparación directa utilizando ésta harina que es una de las más disponibles para substituir la harina de pescado.

En un estudio anterior al presente trabajo, utilizando el intestino invertido (Martínez-Montaña *et al.*, 2010) se obtuvo que harina de soya hidrolizada era

absorbida a una menor velocidad que sus pares hidrolizados de la harina de sardina. Estos autores lo atribuyeron a que posiblemente se hubieran obtenido cortes menores a los obtenidos con harina de pescado y por ende una posibilidad menor de llegar a péptidos de tamaño apropiado para facilitar la absorción intestinal a través de los enterocitos hacia el torrente sanguíneo. Ambas fuentes proteicas, tienen una alta concentración de AAs esenciales, sin embargo se ha demostrado que aun cuando la concentración de AAs como Asp, Leu y Tyr sea la misma tanto en hidrolizados de músculo de sardina, como en hidrolizados de soya, este último siempre es absorbido en menor cantidad (Martínez-Montaña *et al.*, 2010). Esto se le ha atribuido a un problema de respuesta inflamatoria de la soya sobre los tejidos intestinales de peces carnívoros. Reacción que al causar inflamación evita la absorción de los AAs dando lugar a lo conocido como el síndrome del intestino irritado. Este hecho es conocido por lo que se recomienda que la soya para peces carnívoros no sea suministrada en altas proporciones (Thorsen *et al.*, 2008). En el presente trabajo el grado de hidrólisis con ambas fuentes proteicas fue semejante, al emplear el extracto crudo pancreático, (cuadro XIII). Sin embargo, al comparar la distribución de pesos moleculares de las fracciones solubles de ambos hidrolizados, es evidente una fracción de péptidos de menor tamaño en el hidrolizado de harina de pescado y que se ausenta en el hidrolizado de harina de soya (Figura 12). Sugiriendo que los péptidos al ser menores sean absorbidos a mayor velocidad, durante el proceso de absorción intestinal.

La distribución de los pesos moleculares de los péptidos obtenidos tras la hidrólisis, es un reflejo de la afinidad de la enzima con el sustrato, de la composición aminoacídica del mismo y del grado de hidrólisis que alcance la reacción (Guadix *et al.*, 2000). El que el hidrolizado de pescado haya dado lugar a una mayor cantidad de péptidos más pequeños que los obtenidos en la harina de soya, constituye un reflejo de la periodicidad de los AAs que son sensibles al corte de las enzimas pancreáticas. Factor que explica la eficiencia de absorción en el intestino como previamente se había observado (Martínez-Montaña *et al.*, 2010). En el caso de la papaína, que consiste en el látex de papaya crudo, también presenta una mezcla de proteasas como papaína, quimopapaína de varios tipos y papaya peptidasa, mezcla de enzimas no es del todo específica para hidrolizar las distintas fuentes proteicas. Sin embargo, ésta dio lugar a un mayor porcentaje de hidrólisis al ser expuesta a la harina de soya. Hidrólisis que no se refleja en una mayor cantidad de cortes peptídicos como se pudo observar en el cromatograma del HPLC (Figura 11). Este efecto es difícil de explicar, pues al obtener un mayor porcentaje de hidrólisis era de esperarse contar también con una mayor cantidad de péptidos pequeños así como se observó con la harina de pescado.

Por otra parte, el menor grado de hidrólisis de la harina de soya con el extracto pancreático (cuadro XIII) concuerda con lo observado por Li y colaboradores en el 2010, quienes utilizando soya como sustrato, vieron un menor grado de hidrólisis con las proteasas tipo tripsina, que purificaron de bazo de atún aleta amarilla, en un estudio comparativo con dos proteasas comerciales. Ellos atribuyen el bajo grado de hidrólisis de la proteína de soya, a la conformación estructural de la soya,

la cual es muy estable y compacta, característica que puede impedir el acceso a algunos enlaces peptídicos, o bien, a la presencia de glicinina, principal componente de la soya y que resulta resistente a la proteólisis debido a que posee polipéptidos básicos que son menos degradados (Kim *et al.*, 1990). Además, como lo demostró nuestro ensayo de inhibición, el grupo enzimático con mayor actividad en nuestro extracto pancreático de atún es el de las proteasas tipo tripsina, y se ha reportado que la proteína de soya puede contener de 1 a 30 mg/g de inhibidores de tripsina dependiendo el método de procesamiento (Peace *et al.*, 1992).

Hoy en día, el cultivo del mismo atún aleta azul del Pacífico como el de otros peces, es una realidad que se enfrenta a problemas tales como que las pesquerías están disminuyendo aceleradamente, por lo que se hace importante el estudio de sus requerimientos nutricionales, para en un futuro poder diseñar dietas novedosas que utilicen materias no convencionales con el fin de hacer el cultivo de estas especies, de una manera sostenible. Por esta razón, el estudio de las enzimas endógenas de *T. orientalis* nos permite conocer el tipo de péptidos que se obtienen tras la hidrólisis digestiva tanto con harina de pescado como con soya, como se evaluó en este trabajo.

8. CONCLUSIONES

Las vísceras del atún aleta azul del Pacífico, son una fuente de enzimas con alta actividad proteolítica, y poseen potencial para ser empleadas en el desarrollo de hidrolizados proteicos.

Las proteasas alcalinas presentes en el extracto crudo de páncreas de *T. orientalis*, presentan mayor actividad en un intervalo de temperaturas de 50 a 65 °C y con un pH óptimo de 7 a 9.

La mayor actividad del extracto crudo pancreático del atún aleta azul del Pacífico correspondió a la tripsina.

Las proteasas alcalinas presentes en el extracto pancreático mantienen su actividad hasta después de su incubación a 4, 24 y 37 °C durante 3 hrs sin cambiar significativamente su actividad.

El hidrolizado de sardina es una buena fuente de proteína y aminoácidos, aportando específicamente AAs esenciales como la lisina y leucina por lo que este tipo de productos representan una alternativa al procesamiento de especies de poca importancia económica y/o subproductos en harina de pescado.

La fracción más abundante en el hidrolizado de sardina fue la fracción de componentes insolubles, que al mismo tiempo contiene el menor porcentaje de proteína cruda, lo cual podría ser atribuible al método de secado.

La harina de pescado fue mayormente hidrolizada con el extracto enzimático de páncreas de *T. orientalis*, mientras que la harina de soya exhibió una hidrólisis más extensiva con la enzima comercial papaína.

La distribución de los péptidos presentes en las fracciones solubles de los hidrolizados proteicos de una misma fuente proteica, son diferentes al ser comparadas tras la hidrólisis con el extracto crudo pancreático y la papaína.

Al hidrolizar harina de pescado con el extracto pancreático, se genera una fracción de péptidos de menor tamaño, que se ausenta al hidrolizar la harina de soya con la misma fuente enzimática.

9. REFERENCIAS

Adler-Nissen, J., 1986a. Enzymic hydrolysis of food proteins. London: Elsevier Applied Science Publishers; 1986. p. 427.

Anggawati, A. M. y E. J. Heruwati, 1990. The use of hydrolyzed protein concentrate in practical diets for *Penaeus monodon* juveniles. Research Institute for Fish Technology, Palmerath, Jakarta.

A. O. A. C., 1995. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.

Aspmo S. I., S. J. Horn y V. G. H. Eijsink, 2005. Enzymatic hydrolysis of atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. Process Biochemistry, 40: 1957-1966.

Badal, C. S. y H. Kiyoshi, 2001. Debittering of protein hydrolysates. Biotechnology Advances, 19: 355-370.

Berge, G. M. y T. Storebakken, 1996. Fish protein hydrolyzate in starter diets for Atlantic salmon (*Salmon salar*) fry. Aquaculture, 145: 205–212.

Benyon., R. y J. S. Bond, 2001. En: Proteolytic Enzymes: A Practical Approach - 2nd ed, R. Benyon and J.S. Bond, (eds.) Oxford University Press, New York.

Espe, M., Lied E. y K. R. Torrissen, 1993. Changes in plasma and muscle amino acids in Atlantic salmon (*Salmon salar*) during absorption of diets containing different amounts of hydrolysed cod muscle protein. Comp Biochem Physiol A, 105: 555-562.

Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Bucci, L. R. y L. Unlu, 2000. Protein and amino acid supplements in exercise and sport. En Wolinsky, I., J. A. Driskell y F. L. Boca Raton (Eds.), *Energy yielding macronutrients and energy metabolism in sports nutrition*. FL: CRC Press: 191–212.

Caessens, P. W. J. R., W. F. Daamen, H. Gruppen, S. Visser y A. G. J. Voragen, 1999a. β -Lactoglobulin hydrolysis. II. Peptide identification, SH/SS exchange, and functional properties of hydrolysate fractions formed by the action of plasmin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47: 2980-2990.

Diniz, F. M. y A. M. Martin, 1996. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *International Journal of Food Science and Technology*, 31: 419-426.

FAO, 2010. El estado mundial de la pesca y acuicultura 2010. FAO, Roma.

Gildberg, A., I. Batista y E. Strøm, 1989. Preparation and characterization of peptones obtained by a two-step enzymatic hydrolysis of whole fish. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 11: 413–23.

Gildberg, A., 1992. Recovery of proteinase and protein hydrolysate from fish viscera. *Bioresource Technology*, 39: 271–276.

Guadix, A., E. Guadix, M. P. Páez-Dueñas, P. González-Tello y F. Camacho, 2000. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41: 79-89.

Guillaume, J., S. Kaushik, P. Bergot y R. Métailler, 2001. Nutrition and Feeding of Fish and Crustaceans. Watson, J. (Ed). Praxis Publishing Ltd, Chichester, UK; 407.

Haard, N. F., 1990. Enzymes from myosystems. *Journal of Muscle Foods*, 1: 293-338.

Haard, N. F., 1992. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 1: 17-35.

Hjelmeland, K. y J. Raa, 1982. Characteristics of two trypsin type isozymes isolated from the Arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 71: 557–562.

Hung, N. D., M. Vas, E. Cheke y S. Z. A. Bolcsi, 1984. Relative tryptic digestion rates of food proteins. *Journal of Food Science*, 49: 1535-1542.

Huxtable, R. J., 1992. Physiological actions of taurine. *Physiology Review*, 72: 101–163

Kawai, S. y S. Ikeda, 1972. Studies on digestive enzymes of fishes. II. Effect of dietary change on the activities of digestive enzymes in carp intestine. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 39: 265–270.

Kitts, D. D. y K. Weiler, 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1309–1323.

Kirk., O., T. V. Bochert y C. C. Fuglsang, 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 345-351.

Klomklao, S., S. Benjakul y W. Visessanguan, 2004. Comparative studies on proteolytic activity of spleen extracts from three tuna species commonly used in Thailand. *Journal of Food Biochemistry*, 28: 355–372.

Klomklao, S., S. Benjakul, W. Visessanguan, B. K. Simpson y H. Kishimura, 2005. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, 40: 3061–3067.

Korhonen, H. y A. Pihlanto, 2006. Bioactive peptides: production and functionally. *International Dairy Journal*, 16: 945-960.

Kotzamanis, Y. P., E. Gisbert , F. J. Gatesoupe, J. Zambonino Infante y C. Cahu, 2007. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 147: 205–214.

Kristinsson, H. G. y B. A. Rasco, 2000. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 657–666.

Lebenthal, E., P. C. Lee y L. A. Heitinger, 1983. Impact of development of the gastrointestinal tract on infant feeding. *Journal of Pediatrics*, 102: 1-9.

Li, Z.-Y., W. Youravong y A. H.-Kittikun, 2010. Protein hydrolysis by protease isolated from tuna spleen by membrane filtration: A comparative study with commercial proteases. *Food Science and Technology*, 43: 166-172.

Liaset, B., R. Nortvedt, E. Lied y M. Espe, 2002. Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) frames by Protamex (TM) protease. *Process Biochemistry*, 37: 1263–9.

Nilsang, S., S. Lertsiri, M. Suphantharika y A. Assavaning, 2004. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering*, 70: 571-578.

Martínez-Montaña, E., E. Peña, U. Focken y M. T. Viana, 2010. Intestinal absorption of amino acids in the Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*): *In vitro* uptake of amino acids using hydrolyzed sardine muscle at three different concentrations. *Aquaculture*, 299: 134-139.

Matus de la Parra, A. P., A. Rosas, J. P. Lazo y M. T. Viana, 2007. Partial characterization of the digestive enzymes of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiology and Biochemistry*, 33: 223-231.

Mohr, V., 1977. Fish protein concentrate production by enzymatic hydrolysis. En J. B. O. Adler-Nissen, L. Eggum, & M. H. S. Olsen (Eds.). *Biochemical aspects of*

new protein food, (44: 53–62). 11th Meeting of FEBS Federation of European Biochemical Societies, Copenhagen, Denmark.

Ooshiro, Z., 1971. Studies on proteinase in the pyloric caeca of fish. II. Some properties of proteinase purified from the pyloric caeca of mackerel. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 26: 685–690.

Otani, H., Y. Kihara y M. Park, 2000. The immunoenhancing property of dietary casein phosphopeptide preparation in mice. Food and Agricultural Immunology, 12: 165–173.

Peace., R. W., G., Sarwar y S. P. Touchburn, 1992. Trypsin inhibitor levels in soy-based infant formulas and commercial soy protein isolates and concentrates. Food Research International, 25: 137-141.

Pelissier, J . P., 1984. Protéolyse des caséines. Sciences des Aliments, 4:1-35.

Quaglia, G. B. y E. Orban, 1987a. Enzymatic solubilization of proteins of sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases. Journal of the Science of Food and Agriculture, 38: 263–9.

Quaglia, G. B. y E. Orban, 1987b. Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*). Journal of the Science of Food and Agriculture, 38: 271-276.

Robinson, E. H., R. P., Wilson y W. E. Poe, 1980b. Re-evaluation of the lysine Requirement and Lysine utilization by fingerling channel catfish. *Journal of Nutrition*, 110: 2313.

Rustad, T., 2003. Utilization of marine by-products. *Electric Journal of Environmental, Agriculture and Food Chemistry*, 2: 458-463.

Sathivel, S., P. J. Bechtel, J. Babbitt, S. Smiley, C. Crapo, K. D. Reppond y W. Prinyawiwatkul, 2003. Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. *Journal in Food Science*, 68: 2196–200.

Sarath, G., R. S. De la Motte y F. W. Wagner, 1989. Protease assay methods. En: Beynon R, Bond J (Ed) *Proteolytic enzymes: a practical approach*. IRL, Oxford, pp 25-56.

Shahidi, F. e Y. V. A. Janak-Kamil, 2001. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 12: 435-464.

Shahidi, F. y V. Venugopal, 1994. Solubilization and thermostability of water dispersions of muscle structural proteins of Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 1440–1446.

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

Shahidi, F. y Y. Zhong, 2008. Bioactive peptides. *J. AOAC Int.* 2008, 91: 914–931.

Sikorski, Z. E., A. Gildberg y A. Ruiter, 1995. Fish products. En: *Fish and fishery products; composition, nutritive properties and stability*, A. Ruiter (Ed.), Cab International, Oxon, UK, 315–346.

Simpson, B. K. y H. F. Haard, 1987. Cold-adapted enzymes from fish. En: *Food Biotechnology*, D. Knorr (Ed.), Marcel Dekker, New York., 495-528.

Simpson, B. K., 2000. Digestive proteinases from marine animals. En: *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*, N. F. Haard y B. K. Simpson,(Eds.). Marcel Dekker, New York., 531-540.

Stefansson, G., 1988. Enzymes in the fishing industry. *Food Technology*, 42: 64-65.

Stevens, E. D. y J. M. McLeese, 1984. Why bluefin tuna have warm tummies: temperature effect on trypsin and chymiotrypsin. *American Journal of Physiology*, 246 (Regul. Integr. Comp. Physiol., 15), R487–R494.

Strom, T. y J. Raa, 1991. From basic research to new industries with in marine biotechnology: successes and falieres in Norway. En: *Proceedings of seminar on advances in fishery post-harvest technology in southeast Asia*, Kuang H. K., K. Miwa y M. B. Salim (Eds.), Changi Point, Singapore, 63–71.

Suzuki, T., 1981. *Fish and Krill Protein: Processing Technology*; Applied Science: London, U.K., 1981.

Thorsen, J., E., Lilleeng, E. C., Valen y A., Krogdahl, 2008. Proteinase-activated receptor-2: two potential inflammatory mediators of the gastrointestinal tract in Atlantic salmon. *Journal of inflammation*, 5: 18.

Van der Ven, C., 2002. Biochemical and functional characterization of casein and whey protein hydrolysates. A study on the correlations between biochemical and functional properties using multivariate data analysis. Wageningen University. The Netherlands. 170 pp.

Wang, J., J. Hu, J. Cui, X. Bai, Y. Du, Y. Miyaguchi y B. Lin, 2008. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 111: 302–308.

Wang, J.-S., M.-M Zhao, Q.-Z. Zhao y Y.-M. Jiang, 2007. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chemistry*, 101: 1658–1663.

Wasserman, B. P., 1990. Evolution of enzymes technology: progress and prospects. *Food Technology*, 44:118–122.

Wray, T., 1988. Fish Processing: New uses for enzymes. *Food Manufacture*, 63: 64-65.

Zertuche-González, J. A., O. Sosa-Nishizaki, J. G. Vaca-Rodríguez, R. del Moral Simanek, C. Yarish y B. A. Costa-Pierce, 2008. Marine Science Assessment of Capture-Based Tuna (*Thunnus orientalis*) Aquaculture in the

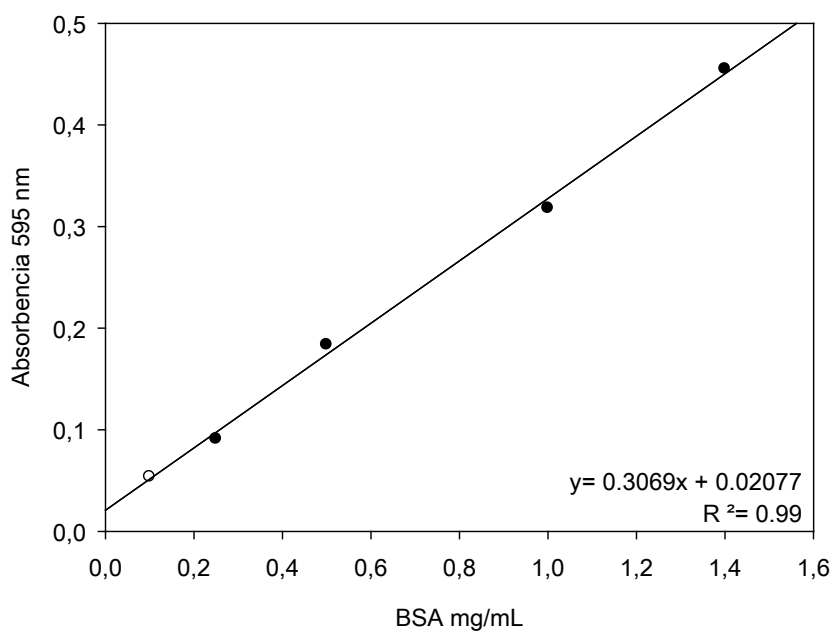
Ensenada Region of Northern Baja California, Mexico. Final Report of the
Binational Scientific Team to the Packard Foundation, Los Altos, CA.

10. ANEXOS

Anexo I. Curva estándar de albúmina de suero de bovino

Para cuantificar el contenido de proteína soluble se realizó una curva estándar utilizando como referencia albúmina de suero bovino (BSA) de acuerdo al método propuesto por Bradford, con el kit comercial (Quick Start™ BIO-RAD; Hércules, CA). Para tal propósito se prepararon cinco diluciones de BSA (500-0007, BIO-RAD®) conteniendo 0.1, 0.25, 0.50, 1 y 1.4 mg/mL de la proteína.

Figura 14. Curva estándar de albúmina de suero de bovino utilizada para la cuantificación de proteína soluble.



Anexo II. Curva estándar para la determinación de pesos moleculares de proteínas

Empleando cromatografía de exclusión molecular –HPLC se construyó una curva estándar con los pesos moleculares de cuatro proteínas: Alcohol deshidrogenasa (150,000 Da), Anhidrasa carbónica (29,000 Da), Citocromo C 12,400 Da) y Aprotinina (6,500 Da) del kit de marcadores de peso molecular para filtración en gel (SIGMA, MW-GF-70). Se inyectaron 20 μ L de cada estándar a una concentración de 1 mg/mL, utilizando la columna ZORBAX Bio Series GF-250 (Agilent). Como fase móvil se utilizó una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.018 M, pH 7.0 NaCl 0.11 M, con una velocidad de flujo fue 1 mL/min. Se obtuvo una relación casi lineal del tiempo de retención y el logaritmo natural (ln) del peso molecular (WM) de las proteínas utilizadas para obtener la curva estándar, los detalles se muestran en el cuadro XIV.

Cuadro XIV. Proteínas utilizadas para la construcción de la curva estándar, empleada para la determinación de pesos moleculares.

Estándar	Tiempo de retención (Min)	Peso Molecular (Da)	Ln WM
Alcohol deshidrogenasa	3.786	150,000	11.91839
Anhidrasa Carbónica	5.148	29,000	10.27505
Citocromo C	5.637	12,400	9.425452
Aprotinina	5.997	6,500	8.779557

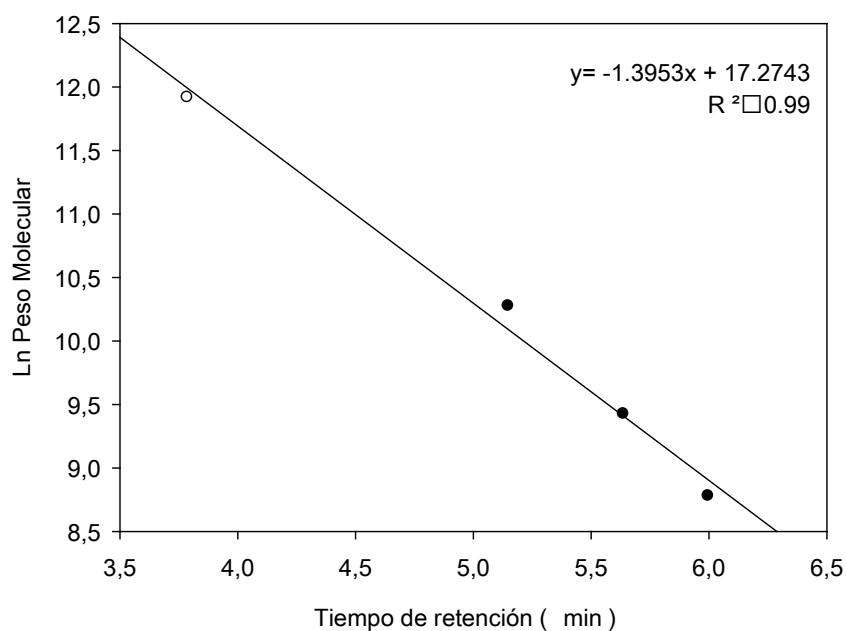


Figura 15. Curva estándar de proteínas obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular-HPLC usando la columna ZORBAX Bio Series GF-250. La fase móvil consistió en solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.018 M, pH 7.0 NaCl 0.11 M. La velocidad de flujo fue 1 mL/min. La absorbencia se monitoreó a 210, 254 y 280 nm.