

TESIS DEFENDIDA POR
Ana Bertha Castro Ceseña
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Facundo Joaquín Márquez Rocha
Director del Comité

Dra. María del Pilar Sánchez Saavedra
Miembro del Comité

Dra. Ernestina Castro Longoria
Miembro del Comité

Dr. Oscar Sosa Nishizaki
Miembro del Comité

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro
*Coordinador del programa de posgrado
en Ciencias con orientación en
Acuicultura y Biotecnología Marina*

Dr. Raúl Ramón Castro Escamilla
Director de Estudios de Posgrado

08 de septiembre de 2006

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

**RECUPERACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS DEL SUBPRODUCTO DE
PROCESAMIENTO DE SARDINA PARA SU UTILIZACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE
HIDROLIZADOS DE SUBPRODUCTO DE SARDINA**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

ING. BIOQ. ANA BERTHA CASTRO CESEÑA

Ensenada, Baja California, México, Septiembre del 2006

RESUMEN de la tesis de **Ana Bertha Castro Ceseña**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en BIOTECNOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California. Septiembre de 2006.

RECUPERACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS DEL SUBPRODUCTO DE PROCESAMIENTO DE SARDINA PARA SU UTILIZACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS DE SUBPRODUCTO DE SARDINA

Resumen aprobado por:

Dr. Facundo Joaquín Márquez Rocha
Director de Tesis

Los subproductos del procesamiento de pelágicos son ricos en proteína de buena calidad, los cuales pueden ser utilizados para preparar concentrados proteicos, hidrolizados e inclusive cócteles enzimáticos con características catalíticas novedosas para la preparación de nuevos productos proteicos con diferentes propiedades funcionales. En el presente trabajo, se desarrolló un proceso para la recuperación de proteasas y lipasas a partir de vísceras y fluidos corporales, y de cabeza, cola y vísceras de sardina, los cuales fueron utilizados para la producción de hidrolizados proteicos de pescado. La eliminación de más del 90% del contenido inicial de grasa se vio favorecida por una etapa de centrifugación a baja temperatura. El siguiente paso de recuperación fue mediante precipitación, el rendimiento de proteína más alto se obtuvo con sulfato de amonio (6.6%), mientras que precipitando con acetona se produjo la mayor recuperación de actividad proteolítica (24.5%), el concentrado proteico obtenido en este paso fue llamado concentrado enzimático. El rendimiento de actividad quimiotripsina puede ser de hasta 58.4% y 33.8% para lipasa. Los posteriores pasos de purificación produjeron bajos rendimientos de proteína y de actividad. El concentrado enzimático contiene diferentes actividades proteolíticas, tales como: quimiotripsina > tripsina > aminopeptidasa > pepsina, se detectó cualitativamente actividad colagenasa; no se detectaron carboxipeptidasas A y B. Los hidrolizados proteicos producidos utilizando diferentes preparaciones enzimáticas fueron caracterizados con respecto al grado de hidrólisis (GH) y la distribución de pesos moleculares. Usando concentrado de vísceras y fluidos corporales se alcanzó un GH del 85%, 62% con concentrado de cabeza, cola y vísceras y 28% con alcalasa. El perfil de pesos moleculares de los hidrolizados fue significativamente diferente. Se logró obtener un procedimiento para la recuperación de proteasas y lipasas con alta actividad a partir de subproducto del procesamiento de sardina, el GH alcanzado utilizando concentrado de vísceras y fluidos corporales es tres veces más alto al obtenido con alcalasa bajo las mismas condiciones de reacción.

Palabras clave: concentrado enzimático, subproducto de sardina, hidrolizados proteicos, recuperación y purificación de enzimas.

ABSTRACT of the thesis presented by **Ana Bertha Castro Ceseña** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree with orientation in MARINE BIOTECHNOLOGY. Ensenada, Baja California. September 2006.

RECOVERY AND PURIFICATION OF ENZYMES FROM SARDINE-BYPRODUCT PROCESING FOR THEIR UTILIZATION TO PREPARE SARDINE-BYPRODUCT HYDROLYSATES

Byproducts from fish pelagic processing are rich in good quality protein, which can be used to elaborate protein concentrates, hydrolysates and even enzyme mix cocktails with novel catalytic characteristics for the preparation of new protein products of different functional properties. In the present work, a proteases and lipases concentrate recovery process were developed from sardine viscera and corporal fluids, and head, tail and viscera, which were utilized for the production of fish protein hydrolysates. A low temperature centrifugation step promoted the elimination of more than 90% of initial fat content. The following recovery step was by precipitation, the highest protein yield was obtained with ammonium sulfate (6.6%), while acetone precipitation produced the highest proteolytic activity recovery (24.5%), the protein concentrate obtained in this step was called enzymatic concentrate. A chymotrypsin activity yield of 58.4% can be reach and 33.8% for lipase. Further protein purification steps produced low protein and activity yields. The enzymatic concentrate contains different proteolytic activities, such as: chymotrypsin > trypsin > aminopeptidase > pepsin, collagenase activity was qualitatively detected; carboxipeptidases A and B were no detected. The protein hydrolysates produced using different enzymatic preparations were characterized by degree of hydrolysis (DH) and molecular weight distribution. An 85% DH was reached using viscera and corporal fluids concentrate, 62% with head, tail and viscera concentrate, and 28% using alcalase. The molecular weight profile of the hydrolysates was significantly different. A procedure to recover proteases and lipases with high activity from sardine-byproduct was achieved, a DH three times higher than the obtained with the commercial enzyme alcalase was reached using viscera and corporal fluids concentrate under the same reaction conditions.

Keywords: enzymatic concentrate, sardine-byproduct, protein hydrolysates, enzyme recovery and purification.

*Con amor a mis padres
Bertha y Arturo,
son mi inspiración*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Facundo Márquez Rocha por sus valiosos consejos y apoyo para la realización del presente trabajo.

A los miembros de mi comité de tesis: Dra. Pilar Sánchez Saavedra, Dra. Ernestina Castro Longoria y Dr. Oscar Sosa Nishizaki por los consejos que he recibido, los cuales seguiré aplicando en el ejercicio de mi profesión.

Deseo expresar mi profundo amor y agradecimiento a mis padres Bertha Ceseña de Castro y Arturo Castro Sandoval por su apoyo incondicional.

A mis compañeros de laboratorio: Gissel Tinoco Orta, Ivonne Santiago Morales, Virginia Villa Cruz, Mildred Herrera Solórzano, René García Sánchez, Jorge Dávila Ortiz y Julien Marcoux, quienes me brindaron apoyo en las técnicas de laboratorio y compañerismo.

Al M. C. Eduardo Morales por sus consejos y apoyo en la utilización de equipo de laboratorio.

A Productos Marinos ABC S. A. de C. V. especialmente al Ing. Ragnar Gutiérrez Abarca por sus atenciones y suministro de subproducto de sardina.

A la M.C. Miriam Poumian por las facilidades otorgadas para la utilización de equipo liofilizador.

Agradezco al CICESE por darme la oportunidad de participar en éste proyecto (CONACYT-SAGARPA 185/A-1).

De igual forma, mi agradecimiento a CONACYT por el apoyo económico que me brindó a través de una beca.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
CONTENIDO.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Diferencia entre subproducto y desecho.....	3
I.2 Descripción general de las sardinas.....	4
I.3 Descripción general de las anchovetas.....	6
I.4 Enzimas.....	8
I.4.1 Enzimas proteasas.....	8
I.4.2 Enzimas lipasas.....	10
I.4.3 Aplicaciones de las enzimas proteasas y lipasas.....	10
I.5 Hidrolizados proteicos como una forma de aprovechamiento del subproducto de pescado.....	11
I.5.1 Mecanismo de la hidrólisis.....	12
I.5.2 Caracterización de los hidrolizados.....	15
I.5.3 Ventajas de la hidrólisis enzimática frente a la hidrólisis química...	16
I.5.4 Aplicaciones de los hidrolizados proteicos de pescado.....	18
II. ANTECEDENTES.....	19
II.1 Estudios sobre caracterización y purificación de enzimas digestivas en peces.....	20
II.2 Estudios sobre producción y caracterización de hidrolizados proteicos de pescado.....	25
II.3 Estudios en subproducto del procesamiento de sardina.....	27
III. OBJETIVOS.....	29
III.1 Objetivo general.....	30
III.2 Objetivos específicos	30
III.4 Alcance del trabajo.....	30

CONTENIDO (continuación)

	Página
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
IV.1 Establecimiento del proceso para la purificación y caracterización de enzimas de subproducto de pescado.....	32
IV.1.1 Organismo utilizado.....	32
IV.1.2 Preparación del extracto crudo.....	32
IV.1.3 Precipitación de proteína.....	34
IV.1.3.1 Precipitación con sulfato de amonio.....	34
IV.1.3.2 Precipitación con acetona.....	34
IV.1.3.3 Precipitación con TCA-acetona.....	35
IV.1.3.4 Precipitación con metanol-cloroformo.....	36
IV.1.4 Procedimiento de purificación de enzimas proteolíticas de vísceras de anchoveta.....	36
IV.2 Purificación de enzimas de subproducto del procesamiento de sardina.....	37
IV.2.1 Obtención de la materia prima.....	37
IV.2.2 Preparación de extractos crudos de vísceras y fluidos corporales y de cabeza, cola y vísceras.....	37
IV.2.2.1 Vísceras fluidos corporales.....	37
IV.2.2.2 Cabeza, cola y vísceras.....	38
IV.2.3 Procedimiento de purificación de enzimas proteolíticas de subproducto del procesamiento de sardina (vísceras y fluidos corporales).....	38
IV.3 Caracterización enzimática parcial.....	41
IV.3.1 Cuantificación de actividad proteolítica.....	41
IV.3.2 Tripsina.....	41
IV.3.3 Quimiotripsina.....	42
IV.3.4 Aminopeptidasa.....	43
IV.3.5 Pepsina.....	43
IV.3.6 Carboxipeptidasa A.....	44
IV.3.7 Carboxipeptidasa B.....	45
IV.3.8 Colagenasa.....	45
IV.3.9 Lipasa.....	46
IV.4 Producción de hidrolizados de subproducto del procesamiento de sardina.....	47
IV.4.1 Preparación del sustrato.....	47
IV.4.2 Hidrólisis enzimática.....	48
IV.4.3 Determinación del grado de hidrólisis.....	49
IV.4.4 Cromatografía de exclusión molecular-HPLC / distribución de pesos moleculares.....	50
IV.5 Otros procedimientos analíticos.....	51
IV.5.1 Cuantificación de proteína soluble.....	51

CONTENIDO (continuación)

	Página
IV.5.2 Análisis proximal de los extractos de vísceras y fluidos corporales.....	51
IV.5.3 Liofilización.....	51
IV.6 Análisis estadístico de los resultados.....	51
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
V.1 Establecimiento del proceso para la obtención y caracterización de enzimas.....	54
V.1.1 Evaluación de las técnicas de precipitación de proteína.....	54
V.1.2 Purificación de enzimas proteolíticas presentes en vísceras de anchoveta.....	56
V.1.3 Purificación de enzimas proteolíticas presentes en subproducto del procesamiento de sardina (vísceras y fluidos corporales).....	59
V.2 Análisis proximal de los extractos de vísceras y fluidos corporales.....	62
V.3 Caracterización de enzimas proteolíticas y lipasa de presentes en subproducto del procesamiento de sardina (vísceras y fluidos corporales y cabeza, cola y vísceras).....	63
V.4 Producción de hidrolizados de subproducto del procesamiento de sardina.....	69
V.4.1 Proceso catalítico de hidrólisis enzimática.....	69
V.4.2 Distribución de pesos moleculares de productos de la hidrólisis..	71
VI. CONCLUSIONES.....	73
VI.1 Uso potencial.....	75
VII. RECOMENDACIONES.....	76
LITERATURA CITADA.....	78
APÉNDICE I. CURVA ESTÁNDAR DE L-LEUCINA.....	84
APÉNDICE II. CURVA ESTÁNDAR DE PESOS MOLECULARES DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS.....	86
APÉNDICE III. CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNA SOLUBLE.....	88
APÉNDICE IV. GLOSARIO.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema general de hidrólisis enzimática para la producción de hidrolizados proteicos de pescado.....	12
2	Proceso de hidrólisis de las proteínas	13
3	Proceso catalítico de una proteasa	13
4	Catálisis de la hidrólisis del enlace peptídico por la quimiotripsina. En ésta figura se muestran los pasos que se siguen en la hidrólisis de una cadena polipeptídica catalizada por la quimiotripsina (Mathews y van Holde, 1998).....	14
5	Estrategia experimental utilizada para la recuperación de proteína y purificación de enzimas proteolíticas tanto para las procedentes de vísceras de anchoveta <i>Engraulis mordax</i> como para las de subproducto del procesamiento de sardina.....	33
6	Estrategia experimental para la obtención de concentrados de enzimas proteolíticas procedentes del subproducto del procesamiento de sardina para ser utilizados en la preparación de hidrolizados de subproducto del procesamiento de sardina.....	40
7	Proceso de hidrólisis enzimática para la producción de hidrolizados proteicos de subproducto del procesamiento de sardina.....	47
8	Actividad proteolítica de las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular del extracto de vísceras de anchoveta concentrado con acetona (0-70%). Elución con Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 0.5 M. La actividad proteolítica está expresada en términos de $\Delta\text{Abs } 366 \text{ nm}/20 \text{ min}$	57
9	Cromatografía de intercambio iónico. Solución amortiguadora de equilibración Tris-HCl 20 mM, pH 7.5. Elución con un gradiente lineal con un incremento en concentración de NaCl desde 0 hasta 0.3 M en solución amortiguadora de equilibración. Una unidad de actividad proteolítica se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de $1\mu\text{mol}$ de grupos azo a partir de azocaseína por minuto bajo las condiciones de ensayo.....	61

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
10	Cromatografía de exclusión molecular-HPLC de los sobrenadantes obtenidos después de 312 min de hidrólisis. Las gráficas muestran la señal del monitoreo a 254 nm. Se muestran los hidrolizados de las reacciones con alcalasa, concentrado de vísceras y fluidos corporales y concentrado de cabeza, cola y vísceras (gráficas b – d, respectivamente) y el sustrato (a). Se inyectó una muestra diluida 1:100, el volumen inyectado fue el mismo. n = 3. En la parte superior de la figura se muestra un eje de masa molecular derivado de experimentos con compuestos estándar. Nótese que éste eje proporciona una aproximación del tamaño del compuesto.....	72
11	Curva estándar para la cuantificación de grupos α -amino de acuerdo al método de TNBS usando como referencia una solución de L-leucina 6 mM.....	85
12	Curva estándar de proteínas y péptidos obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular-HPLC usando una 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 absorbancia se monitoreó a 210, 220, 230, 254 y 410 nm.....	87
13	Curva estándar para la cuantificación de proteína soluble de acuerdo al método de Bradford usando como referencia una solución de BSA (0.2 mg/ml).....	88

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Resultados de los diferentes métodos de precipitación utilizados para concentrar enzimas proteolíticas de vísceras de anchoveta (<i>Engraulis mordax</i>).....	55
II	Purificación de enzimas proteolíticas de vísceras de anchoveta <i>Engraulis mordax</i>	58
III	Caracterización parcial de enzimas proteolíticas de vísceras de anchoveta <i>Engraulis mordax</i>	58
IV	Purificación de enzimas proteolíticas de subproducto del procesamiento de sardina (vísceras y fluidos corporales).....	59
V	Caracterización parcial de enzimas proteolíticas de subproducto del procesamiento de sardina (vísceras y fluidos corporales).....	60
VI	Resultados del análisis proximal realizado a la materia prima (vísceras y fluidos corporales) así como al extracto crudo.....	63
VII	Purificación parcial de proteasas y lipasas del subproducto del procesamiento de sardina (vísceras y fluidos corporales) ^a	65
VIII	Caracterización parcial de enzimas proteolíticas del subproducto del procesamiento de sardina (vísceras y fluidos corporales) ^a	65
IX	Purificación parcial de proteasas y lipasas del subproducto del procesamiento de sardina (cabeza, cola y vísceras) ^a	66
X	Caracterización parcial de enzimas proteolíticas del subproducto del procesamiento de sardina (cabeza, cola y vísceras) ^a	66
XI	Resultados de actividades enzimáticas en concentrados de vísceras y fluidos corporales y de cabeza, cola y vísceras de sardina ^a	67

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla		Página
XII	Grado de hidrólisis del subproducto del procesamiento de sardina logrado usando alcalasa y extractos concentrados de enzimas endógenas en una relación E/S = 25% en un tiempo de reacción de 312 min a 30 °C ^a	70
XIII	Diluciones para la construcción de una curva estándar de L-leucina.....	84
XIV	Proteínas y péptidos utilizados para la construcción de una curva estándar para determinación de peso molecular de proteínas y péptidos.....	86
XV	Diluciones para la construcción de una curva estándar de proteína soluble.....	88

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

México se encuentra entre los países costeros más grandes del mundo. Cuenta con casi 10,000 km de costas en cuatro mares, el Océano Pacífico, el Golfo de California, el Golfo de México y el Mar Caribe. Este extenso litoral representa una longitud de costa de 6,608 km para el Pacífico mexicano y 2,611 km de longitud en el Océano Atlántico. Baja California se encuentra entre los estados con mayor producción pesquera, tiene un litoral de 1,250 km (Ruíz-Durá, 1985). La especie con mayor captura a nivel nacional y estatal es la sardina (189,115 toneladas y 46,431 toneladas, respectivamente, en 2003) (SIAP con datos de CONAPESCA). El procesamiento que se da a la sardina desde su captura hasta su comercialización consiste en aprovechar únicamente la parte central de su cuerpo dado que la cabeza, la cola y las vísceras se extraen y se descartan, lo que significa una pérdida de proteína de buena calidad. Se ha reportado que globalmente la descarga anual mundial de subproductos de pescado se estima en veinte millones de toneladas (25%) por año (Rustad, 2003). Además, si no se dispone adecuadamente de los subproductos, éstos se convierten en contaminantes, ocasionando problemas ecológicos. Por lo tanto, es muy importante y necesario el desarrollo de procesos para el aprovechamiento y utilización de los subproductos de pescado.

Una manera de dar valor agregado a éstos subproductos, es la utilización a nivel industrial de enzimas procedentes de subproductos de pescado (proteasas y lipasas), ya que éstas tienen aplicaciones en muy diversas áreas, las cuales incluyen medicina, cosmetología, alimentos, tratamiento de aguas residuales y en la industria farmacéutica (Alarcón-López, 1997; Burkert *et al.*, 2004). Otra aplicación es la

obtención de hidrolizados proteicos de pescado (Aspmo *et al.*, 2005; Kristinsson y Rasco, 2000, y Gilmartin y Jervis, 2002).

El presente trabajo describe un proceso para la recuperación y purificación de enzimas de subproducto del procesamiento de sardina y su utilización para la obtención de hidrolizados proteicos como una forma de aprovechar y dar un valor agregado a dichos subproductos, ya que existe un valor de mercado para ellos.

Desde el inicio del proyecto se evaluó que el procedimiento de recuperación de enzimas que se propusiera pudiera aplicarse no sólo para sardina sino también para cualquier otro organismo. La anchoveta tiene una amplia concurrencia alimentaria con la sardina, pues ambos peces son omnívoros, lo que sugiere una gran similitud en las enzimas digestivas que poseen. Por lo que, con la finalidad de evaluar la recuperación de enzimas en otros peces pelágicos, ésta se llevó a cabo tanto en sardina como en anchoveta.

A continuación, se hace diferencia entre subproducto y desecho, se presentan una descripción general de los organismos utilizados, características generales sobre las enzimas proteasas y lipasas; así como la definición, características y aplicaciones de los hidrolizados proteicos de pescado.

I.1 Diferencia entre subproducto y desecho

Es importante considerar a qué se le llama subproducto y su diferencia con respecto a los desechos. Los subproductos de pescado pueden ser definidos como aquellos productos que no son considerados para su venta ordinaria (cabeza, cola y vísceras), pero que pueden ser utilizados después de un tratamiento adecuado. El término subproducto indica aquello que puede ser vuelto a utilizar, esto es, toda la materia

prima, comestible o no comestible, generada durante el procesamiento del producto principal. Los desechos son aquellos productos que no pueden ser usados y que no tienen un valor agregado y entonces deben ser calcinados o destruidos (Rustad, 2003).

I.2 Descripción general de las sardinas

La descripción de las sardinas se llevó a cabo de acuerdo a Ruíz-Durá (1985), a excepción de los párrafos en que se indique lo contrario.

Las sardinas pertenecen a la familia Clupeidae y está integrada por seis especies: *Sardinops sagax caerulea* (sardina, sardina del Pacífico, sardina Monterrey, en Estados Unidos (E. U. A.): “pacific sardine”). *Opisthonema libertate* (sardina crinuda, arenque de hebra del Pacífico, sardina machete, en E. U. A.: “thread herring”). *Harengula thrissina* (sardina escamuda, sardina rayada, arenque, en E. U. A.: “flatiron herring”). *Pliostestoma lutipinnis* (sardina machete). *Lile stolifera* (sardina rayada, arenque, en E. U. A.: “herring”). *Opisthonema oglinum* (sardina, arenque de hebra, en E. U. A.: “thread herring”, “Atlantic threadfin”).

La sardina en México se circunscribe básicamente a las capturas del océano Pacífico, siendo las especies más importantes la *sardina Monterrey* y la *sardina crinuda*. En el Golfo de México se capturan otras especies, pero por su reducido volumen no se les consideran como integrantes de la pesquería.

Las principales áreas de pesca de sardina se localizan en cuatro regiones: *región de puerto Peñasco*: del estero Murúa a bahía Salinas. *Región de Guaymas*: desde el estero de Tacitota hasta bahía del Tóbari. *Región de Topolobampo*: desde punta

Ahome hasta isla Altamura y *región de Mazatlán*: desde punta Piaxtla hasta Teacapan.

En la costa occidental de Baja California, las principales áreas de pesca se localizan desde la frontera con los Estados Unidos hasta Punta Salsipuedes; de Punta Salsipuedes hasta Punta Santo Tomás; entre Punta Santo Tomás y Punta Colonet; de Punta Colonet a Isla San Martín; y de Isla San Martín a Punta Baja (García-Franco *et al.*, 2001).

Los principales puertos de desembarque de la sardina, en orden de importancia, son: isla de Cedros, Baja California (B. C.); San Carlos, B. C. Sur; Puerto Alcatraz, B. C. Sur; Guaymas, Son.; Paraje Nuevo, Son.; Yavaros, Son.; Topolobampo, Sin.; Mazatlán, Sin.; también se registran pequeñas cantidades de sardina en Culiacán y Escuinapa, Sin.; Salina Cruz, Oax.; y Celestún, Yucatán.

Todas las sardinias presentan el cuerpo pequeño y comprimido, poco elevado, y por lo general en forma de huso. El perfil ventral se caracteriza por presentar una serie de quillas localizadas por delante del orificio anal, que le dan una apariencia de vientre aserrado. Presentan una sola aleta dorsal de forma trapezoidal.

Por el carácter de su alimentación las sardinias pertenecen a los peces omnívoros, consumen tanto fitoplancton como zooplancton, teniendo una gran concurrencia alimentaria con las anchovetas. Muestran preferencia por los lugares de intenso desarrollo de fitoplancton, o sea, las áreas de surgencias. De los clupeidos se alimentan todos los grandes carnívoros de la región como tiburones, barracudas, así como aves y mamíferos. Las vísceras de las sardinias son una fuente rica de enzimas hidrolíticas (Castillo-Yáñez *et al.*, 2004), entre ellas las enzimas proteasas y lipasas.

I.3 Descripción general de las anchovetas

La descripción de las anchovetas se llevó a cabo de acuerdo a Ruíz-Durá (1985), a excepción de los párrafos en que se indique lo contrario.

Las anchovetas pertenecen a la familia Engraulidae y está integrada por tres especies: *Engraulis mordax* (anchoveta, anchoa, en E. U. A.: “northern anchovy”, “California anchovy”). *Anchoa* ssp. (anchoveta , anchoa). *Catengraulis mysticetus* (anchoveta, anchoa, bocona).

La anchoveta norteña *Engraulis mordax* es la especie más abundante y mayormente capturada en la costa occidental de Baja California (García-Franco, 2001). Se distribuye desde la isla Queen, Charlotte, Columbia Británica hasta cabo San Lucas, B. C.; es común desde San Francisco, California, hasta bahía Magdalena, México.

Las operaciones de captura se realizan en la noche, ya sea mediante la detección electrónica (sonar) del cardumen o visualizándolo por el efecto de la fosforescencia que producen los peces.

Las áreas de pesca se encuentran localizadas desde punta Concepción hasta punta Eugenia, B. C., con mayor abundancia alrededor de islas Coronados, al sur de Punta San José y al sur de Punta San Ignacio y en algunos meses al sur de Isla Margarita.

En la costa occidental de Baja California, las principales áreas de pesca se localizan desde la frontera con los Estados Unidos hasta Punta Salsipuedes; de Punta Salsipuedes hasta Punta Santo Tomás; entre Punta Santo Tomás y Punta Colonet; de Punta Colonet a Isla San Martín; y de Isla San Martín a Punta Baja (García-Franco *et al.*, 2001).

El grado de concentración de la anchoveta crece notablemente durante el periodo de desove, pudiéndose aprovechar esta situación para efectuar la captura. La anchoveta se captura los doce meses del año y con mayor intensidad de marzo a octubre.

Las anchovetas pertenecen al Orden Clupeiformes; son peces de talla pequeña que se caracterizan por tener el cuerpo alargado, poco comprimido, y en general muy parecido al de las sardinas de las que se diferencian, fundamentalmente, por: presentar la mandíbula inferior más corta que la superior, la boca muy grande con los maxilares prolongados por detrás del ojo y por carecer de escudetes óseos en la región ventral.

Todos los representantes del recurso pertenecen a la familia *Engraulidae*. Algunos autores, consideran al género *Engraulis* de aguas mexicanas, como una subespecie: *Engraulis mordax* que se extiende hasta aguas de E. U. A.

Son peces altamente migratorios, que se distinguen por congregarse en grandes cardúmenes que se condensan en áreas pelágico-costeras o de litoral.

Se encuentran en aguas oceánicas con temperaturas superficiales que oscilan entre 14.5 y 20 °C. Efectúan migraciones verticales durante el día sumergiéndose en las capas inferiores. De noche se desplazan hacia las capas superiores.

En las capturas comerciales se presentan básicamente individuos de uno o dos años con tallas de 8 a 14 cm. Los individuos de esta especie alcanzan la madurez sexual al completar un año de vida, tiempo en el que miden entre los 9.0 y los 10.0 cm de longitud total.

I.4 Enzimas

Las enzimas son catalizadores de origen proteico producidas por los organismos vivos. Cada reacción que se lleva a cabo en la célula es catalizada por una enzima en particular, por lo tanto, en una célula se encuentran un gran número de enzimas. Estas enzimas funcionan como catalizadores de las reacciones químicas vitales que, sin su presencia no se desarrollarían sino en un periodo de años. Por lo tanto, son responsables de las transformaciones metabólicas en los seres vivos. Aceleran reacciones bioquímicas en relación con reacciones no catalizadas a temperaturas alrededor de 37°C. En contraste, los catalizadores industriales (sustancias inorgánicas) están dotados de una eficacia inferior que las enzimas (Rodríguez-Serrano, 1999). Cabe señalar que el término de “catalizador biológico” no es exclusivo de las enzimas, ya que es bien reconocido que tanto el ARN como la hemoglobina poseen actividades catalíticas (Rodríguez-Serrano, 1999).

I.4.1 Enzimas proteasas

Las proteasas (peptidasas) son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos que forman la estructura primaria de las proteínas. Están presentes en todos los organismos, desde las bacterias hasta las plantas y animales (Alarcón-López, 1997). Existen dos tipos básicos de proteasas: las endopeptidasas y las exopeptidasas (Rivera-Santos, 2003).

Entre las endopeptidasas más importantes cabe citar a las siguientes: la *pepsina* (EC 3.4.23) que es una endopeptidasa ácida presente en el jugo gástrico de mamíferos, aves, anfibios y peces. El pH óptimo de actividad es de 1.0. Es inhibida por pepstatina A, un pentapéptido producido por *Actinomycetes*. La *tripsina* (EC

3.4.21.4) es una endopeptidasa pancreática que hidroliza los enlaces peptídicos constituidos por lisina y arginina. La enzima se sintetiza como un precursor o zimógeno inactivo (tripsinógeno) que es activado en la luz del sistema digestivo por la enteroquinasa presente en la membrana de los enterocitos. Ésta a su vez, se encarga de la activación del resto de zimógenos pancreáticos (quimiotripsinógeno, procarboxipeptidasa A y B y proelastasa, entre otros). Su pH óptimo se sitúa alrededor de 8.0. La *quimiotripsina* (EC 3.4.21.1) es una enzima cuya especificidad de sustrato implica l-isómeros de tirosina, fenilalanina y triptófano. Los extractos pancreáticos contienen tres formas inactivas (quimiotripsinógeno A, B y C) que difieren en su punto isoeléctrico y peso molecular (Alarcón-López, 1997). Las colagenasas son generalmente definidas como enzimas capaces de degradar una cadena polipeptídica.

Dentro de las exopeptidasas destacan: las *aminopeptidasas* (EC 3.4.11) las cuales catalizan la hidrólisis de los restos aminoácidos, concretamente desde el extremo amino de un péptido. Se clasifican en función de los requerimientos de iones metálicos (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} o Co^{2+}) y la especificidad por determinados dipéptidos. Se encuentran presentes en numerosos tejidos de plantas y animales, constituyendo una fracción sustancial de las enzimas presentes en algunas células. Entre sus diversas funciones destacan: la maduración de proteínas, degradación terminal de proteínas, regulación hormonal y control del ciclo celular. Las *carboxipeptidasas* son exopeptidasas que liberan residuos aminoácidos del extremo carboxiterminal de los péptidos y proteínas (Alarcón-López, 1997).

Las serina colagenasas están involucradas en la producción de hormonas y péptidos farmacológicamente activos, así como en varias funciones celulares, las

cuales incluyen la digestión de proteínas, coagulación de la sangre, fibrinólisis, activación del complemento y fertilización (Park *et al.*, 2002).

1.4.2 Enzimas lipasas

Las lipasas (glicerol éster-hidrolasas, EC 3.1.1.-) son hidrolasas que actúan sobre los enlaces carboxil-éster presentes en acilgliceroles para liberar ácidos orgánicos y glicerol. Los triacilgliceroles son, principalmente, lípidos insolubles que no poseen carga, aunque los ácidos grasos de cadena corta son ligeramente solubles en agua (Prim *et al.*, 2003). Bajo ciertas condiciones catalizan la reacción inversa, produciendo glicéridos a partir de glicerol y ácidos grasos (Burkert *et al.*, 2004). En contraste con las esterasas, las lipasas son activadas sólo cuando están adsorbidas en una interfase aceite-agua y no hidrolizan sustratos disueltos en el fluido completo (Sharma *et al.*, 2001).

1.4.3 Aplicaciones de las enzimas proteasas y lipasas

En los últimos años se ha incrementado el uso de enzimas proteolíticas de organismos marinos con base en determinadas propiedades, tales como su elevada actividad a bajas temperaturas y la capacidad de hidrolizar proteínas no desnaturalizadas previamente. Existe un gran número de aplicaciones de las enzimas procedentes de los subproductos de pescado. Aproximadamente un 60% de las enzimas industriales son proteasas y se usan para la fabricación de detergentes, procesado de cueros y alimentos (Alarcón-López, 1997). Por otro lado, el interés en las enzimas lipasas ha incrementado también en las últimas décadas, esto debido a su gran potencial para aplicaciones industriales como aditivos en alimentos

(modificadores del sabor), en la síntesis de ésteres, detergentes (hidrólisis de grasas), en el tratamiento de aguas residuales (descomposición y remoción de sustancias aceitosas), cosméticos (remoción de lípidos), sustancias farmacéuticas (digestión de aceites y grasas en alimentos), remoción de lípidos en pieles procedentes de animales y en la medicina (detección de triglicéridos en sangre) (Burkert *et al.*, 2004).

I.5 Hidrolizados proteicos como una forma de aprovechamiento del subproducto de pescado

La hidrólisis proteica enzimática es definida como la disociación de la estructura primaria de las proteínas en péptidos y aminoácidos mediante enzimas proteolíticas (Van der Ven, 2002). Los hidrolizados proteicos de pescado pueden ser obtenidos mediante dos métodos. El primero depende de las propias enzimas digestivas que el pez posee (autólisis), mientras que el segundo método está basado en la hidrólisis de la materia prima mediante enzimas comerciales (Rustad, 2003). En la Figura 1 se muestra un esquema general del proceso de hidrólisis.

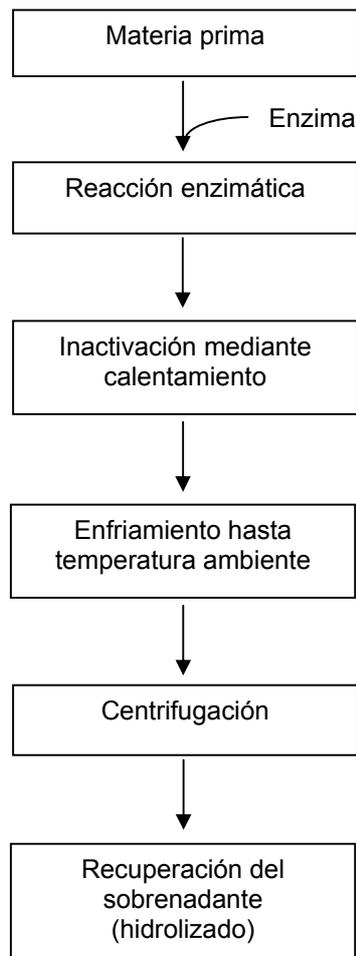
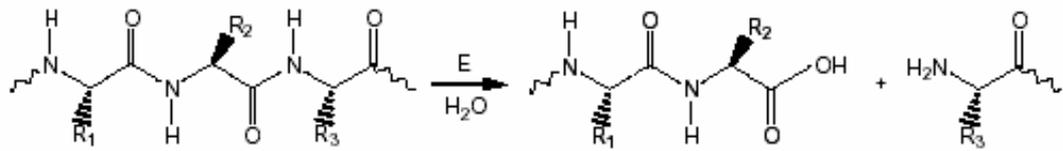


Figura 1. Esquema general de hidrólisis enzimática para la producción de hidrolizados proteicos de pescado.

1.5.1 Mecanismo de la hidrólisis

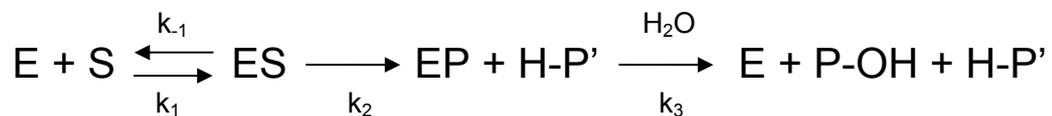
Durante la hidrólisis proteica los enlaces amida son disociados y después de la adición de una molécula de agua, los péptidos y los aminoácidos son liberados (Figura 2). Los péptidos recién formados pueden ser nuevos sustratos para la enzima (Van der Ven, 2002).



R₁, R₂, R₃: aminoácidos de los grupos laterales; E: enzima

Figura 2. Proceso de hidrólisis de las proteínas (Van der Ven, 2002).

Se ha propuesto que el proceso de hidrólisis ocurre en tres reacciones consecutivas. Primero se forma un complejo entre el sustrato (la proteína) y la enzima, luego el enlace peptídico es hidrolizado resultando en la liberación de un péptido, y finalmente, el péptido restante es liberado de la enzima después de un ataque nucleofílico por una molécula de agua. Estos tres pasos se muestran esquemáticamente en la Figura 3 (Van der Ven, 2002).



E: enzima, S: sustrato, P, P': péptidos resultantes, k: constantes de velocidad de reacción

Figura 3. Proceso catalítico de una proteasa (Van der Ven, 2002).

Para ejemplificar las reacciones anteriores, en la Figura 4 se describe la catálisis de la hidrólisis del enlace peptídico por quimiotripsina, en la que se observan todos los pasos indicados en la Figura 3. En primer lugar, el sustrato polipeptídico se une de forma no covalente con las cadenas laterales del bolsillo hidrófobo (paso 1). Este bolsillo define no sólo la posición de la disociación del enlace peptídico

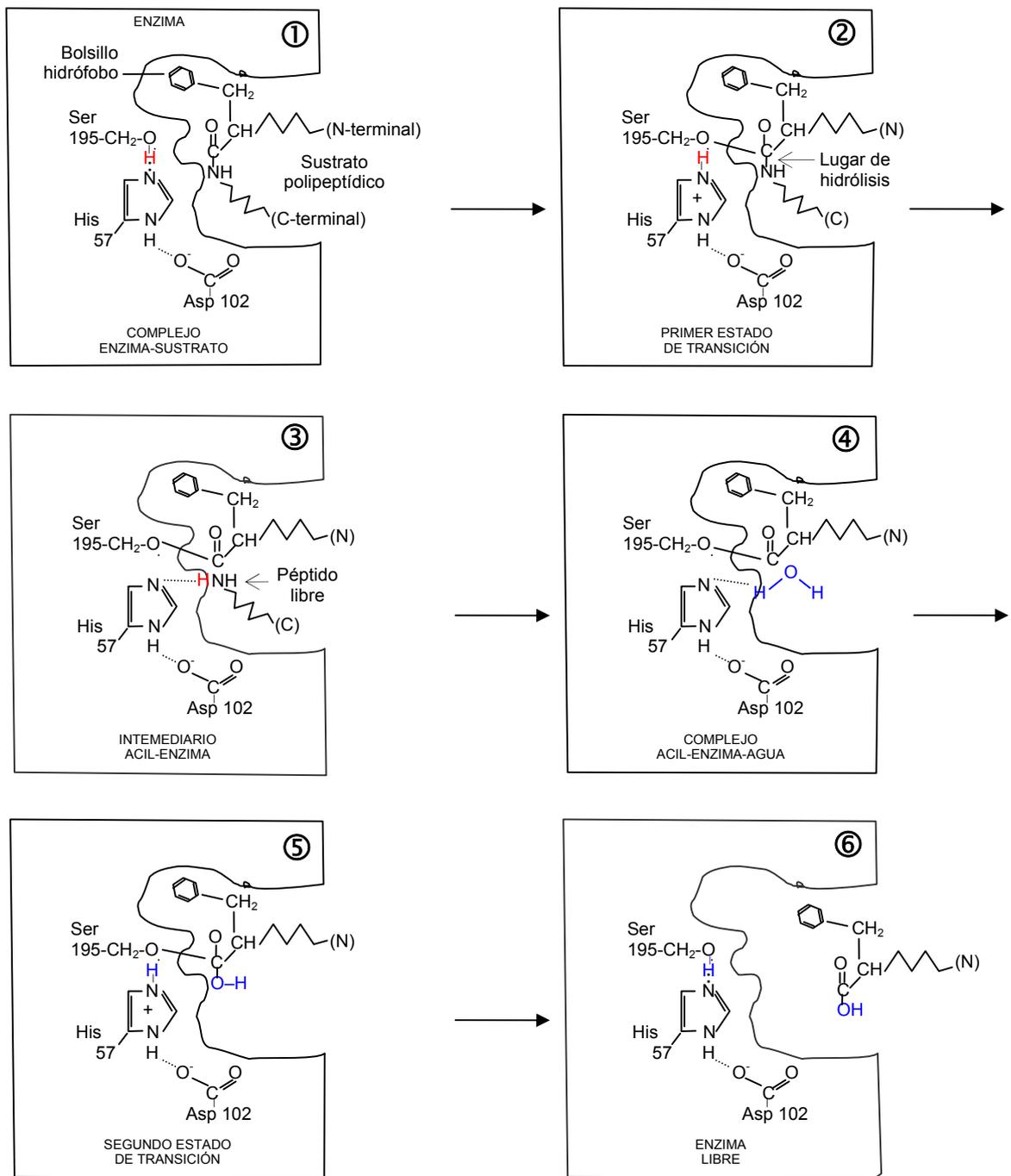


Figura 4. Catálisis de la hidrólisis del enlace peptídico por la quimiotripsina. En ésta figura se muestran los pasos que se siguen en la hidrólisis de una cadena polipeptídica catalizada por la quimiotripsina (Mathews y van Holde, 1998).

sino también la estereoespecificidad de la enzima. Esta unión muy específica de un tipo concreto de aminoácido sitúa a la serina (Ser) del lugar activo próxima al grupo carbonilo del enlace a disociar. El protón de la serina se transfiere al anillo de histidina (paso 2), dejando una carga negativa en la serina. Normalmente, esta transferencia sería improbable, pero parece facilitarse por Aspartato (Asp) 102, que, por su carga negativa, estabiliza la protonación del anillo de histidina adyacente. La serina activada es un fuerte nucleófilo y puede atacar al carbonilo del sustrato, formando un estado de transición tetraédrico. En el paso 3 se transfiere el protón de la histidina (que originalmente era el protón de la serina) al fragmento C-terminal, que se libera por la disociación del enlace C-N. El péptido N-terminal está unido a través de un enlace acilo a través de la serina. En el paso 4, una molécula de agua se une a la enzima en lugar del polipéptido separado; en el paso 5, la molécula de agua transfiere su protón a la Histidina (His) 57 y a continuación se une al intermediario acilo para formar un segundo estado de transición tetraédrico. Obsérvese que éste proceso es esencialmente una inversión de la formación del intermediario acilo inicial, y que la molécula de agua desempeña el papel de la parte liberada de la cadena polipeptídica. Por último, (paso 6), se disocia el enlace acilo, el protón se transfiere de nuevo desde His a Ser, y se libera el resto de la cadena polipeptídica. La enzima vuelve a su estado original, y está preparada para catalizar la hidrólisis de otra cadena (Mathews y van Holde, 1998).

1.5.2 Caracterización de los hidrolizados

La caracterización de los hidrolizados enzimáticos ha sido realizada mediante estudios para determinar: el grado de hidrólisis, la distribución del peso molecular,

solubilidad, capacidades emulsificante y espumante, sabor, digestibilidad, hipoalergenicidad y actividad microbiana (Van der Ven, 2002), así como análisis proximales del hidrolizado para determinar su composición de proteínas, lípidos, humedad y cenizas (Kristinsson y Rasco, 2000); esto principalmente a través de la utilización de técnicas como electroforesis, cromatografía y espectrometría de masas (Aspmo *et al.*, 2005, Van der Ven, 2002, Kristinsson y Rasco, 2000, Maehashi *et al.*, 1999).

Debido a la hidrólisis de las proteínas, las propiedades moleculares de los péptidos obtenidos cambian, como disminución del peso molecular, exposición de los grupos hidrofóbicos y alejamiento de las cadenas laterales de aminoácidos reactivos. Estos cambios moleculares pueden ser detectados con diferentes métodos analíticos, los cuales reflejan una o varias propiedades moleculares (Van der Ven, 2002).

El parámetro más comúnmente usado para describir el resultado de un proceso de hidrólisis es el grado de hidrólisis (GH), el cual es usado como un indicador de la extensión de la hidrólisis. Otro parámetro importante en la hidrólisis de proteínas es la distribución del peso molecular de los péptidos en los hidrolizados. La distribución del peso molecular es indicada mediante SDS-PAGE (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sodio) o por cromatografía de exclusión molecular. Estas técnicas son principalmente usadas para comparar la acción hidrolítica de varias proteasas (Van der Ven, 2002).

1.5.3 Ventajas de la hidrólisis enzimática frente a la hidrólisis química

La hidrólisis enzimática presenta indudables ventajas frente a la hidrólisis química, ácida o alcalina, entre las cuales se encuentran (Guadix *et al.*, 2000):

1. Selectividad. Las enzimas son específicas para un tipo determinado de enlace y, por tanto, no es frecuente la aparición de productos de degradación. En cambio, la poca selectividad de los ataques ácido y básico y su difícil control conducen a la aparición de productos de degradación que pueden llegar a ser tóxicos.
2. Condiciones moderadas de temperatura y pH. Transcurre generalmente en el intervalo de 40 a 60°C y un pH comprendido entre 4.0 y 8.0.
3. No se añaden sustancias extrañas. Evidentemente no es así en los procesos de hidrólisis química, ya que la necesaria neutralización posterior eleva considerablemente el contenido en sales.
4. Se mantiene el valor nutritivo, ya que no se produce degradación de los componentes separados, mientras que la hidrólisis alcalina destruye los aminoácidos arginina y cisteína y la hidrólisis ácida elimina el triptófano y desamina los aminoácidos serina y treonina.

No obstante, se conoce que pueden existir problemas de alergenicidad debidos a la presencia en el hidrolizado de péptidos de elevado peso molecular, y que durante el proceso de hidrólisis se produce un cierto amargor, que parece estar relacionado con la hidrofobicidad de las cadenas laterales y con la fuente proteínica utilizada. Pero en cualquier caso, ambos factores desaparecen para productos formados por péptidos de peso molecular inferior a 1,000 Da. Por lo tanto, el control del proceso de reacción y la caracterización de los hidrolizados con base en el tamaño de los péptidos son objetivos importantes en la hidrólisis de proteínas (Guadix *et al.*, 2000).

1.5.4 Aplicaciones de los hidrolizados proteicos de pescado

Los hidrolizados proteicos de pescado tienen una gran variedad de aplicaciones potenciales, tales como ingredientes en alimentos para animales, ingredientes en medios de cultivo microbianos, fertilizantes (Aspmo *et al.*, 2005) y como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas entéricas con destino a la alimentación infantil y/o de adultos enfermos (Guadix *et al.*, 2000).

ANTECEDENTES

II. ANTECEDENTES

II.1 Estudios sobre caracterización y purificación de enzimas digestivas en peces

Agrawal *et al.*, en 1975, llevaron a cabo un estudio sobre las enzimas digestivas de tres peces teleósteos: *Wallago attu* (pez gato), *Clarias batrachus* (pez gato caminante) y *Labeo rohita* (carpa), en los cuales se examinaron las actividades amilasa y sacarasa (también conocida como invertasa), proteasa y lipasa. Los resultados encontrados fueron los siguientes: el valor del pH óptimo para las carbohidrasas (amilasa y sacarasa) se encuentra entre 5.0 y 7.0 y para la tripsina entre 6.8 y 7.8. La lipasa es activa en un medio ligeramente más alcalino. El pH óptimo de actividad para una determinada enzima varía en las diferentes secciones del tracto digestivo en el mismo pez y también de una especie a otra. También se encontraron variaciones para la concentración óptima de sustrato para una determinada enzima en las diferentes secciones del tracto digestivo. La actividad de las carbohidrasas es mayor en el pez herbívoro *Labeo*, que en el pez carnívoro *Wallago* y en el pez omnívoro *Clarias*. La máxima actividad proteasa se encontró en *Wallago*, y no se encontró diferencia para la actividad lipasa.

Murakami y Noda, en 1981, llevaron a cabo dos estudios sobre proteinasas de los órganos digestivos de sardina. En el primero de ellos realizaron la purificación y caracterización de tres proteinasas alcalinas designadas I, II y III, encontradas en el ciego pilórico. Las enzimas fueron recuperadas y purificadas mediante precipitación con sulfato de amonio, cromatografía DEAE-celulosa y filtración en gel con Sephadex

G-100. Los pesos moleculares de las enzimas I, II y III fueron determinadas mediante el método de equilibrio de sedimentación los cuales fueron 22,900; 28,700 y 27,000, respectivamente. Los puntos isoeléctricos fueron 5.45, 5.30 y 4.85, respectivamente. Las enzimas II y III tienen una composición de aminoácidos similar la cual es diferente de la composición de la enzima I, especialmente en el contenido de lisina, valina y tirosina. Todas las enzimas pertenecieron a un grupo de serina proteasas. Se encontró que la enzima II es parecida a una α -quimiotripsina aniónica y la enzima III es parecida a una tripsina aniónica. También se encontró que aunque estas enzimas de sardina tienen propiedades comunes a aquellas de la tripsina y quimiotripsina catiónicas pancreáticas bovinas, éstas son diferentes en su pH óptimo, la estabilidad de su pH, su carga neta y propiedades inmunológicas.

El segundo de los estudios llevados a cabo por Noda y Murakami en 1981, comprendió la purificación y caracterización de dos proteinasas ácidas designadas I y II del estómago de sardina. La recuperación y purificación de las enzimas fue mediante precipitación con sulfato de amonio, cromatografía CM-celulosa y filtración en gel con Sephadex G-100. Los pesos moleculares de las enzimas I y II fueron determinados mediante el método de equilibrio de sedimentación los cuales fueron 37,000 y 33,400, respectivamente. Se encontró que las enzimas I y II tienen una composición de aminoácidos similar excepto por el contenido de histidina, arginina, treonina, serina y prolina. Se encontró que estas enzimas son similares en la estructura de su sitio activo a la pepsina de mamíferos y a las proteinasas ácidas microbianas teniendo dos grupos carboxilo diferentes, aunque difieren con respecto al número de propiedades moleculares y enzimáticas.

Olivas-Burrola *et al.* (2001), evaluaron las actividades proteasa y tripsina del sistema digestivo de la sierra tropical *Scomberomorus concolor*. La recuperación y caracterización de las enzimas fueron llevadas a cabo mediante centrifugación, precipitación con sulfato de amonio y SDS-PAGE de un extracto homogéneo crudo. Los extractos del sistema digestivo de la sierra hidrolizaron sustratos específicos para tripsina, quimiotripsina y aminopeptidasa leucina. Mediante SDS-PAGE se observaron por lo menos ocho bandas de actividad. Usando electroforesis en gel de poliacrilamida y ensayos de inhibición de serina se encontró que una de las fracciones asemeja la tripsina bovina. Una fracción de tripsina precipitada con sulfato de amonio (40-60%) mostró diferentes inhibiciones con tosil-lis-clorometil cetona (96%) y un inhibidor de tripsina de soya (100%).

Nayak *et al.* (2003), midieron la actividad lipasa en el estómago y ciego pilórico, hígado, intestino y músculo rojo de cuatro especies de pescado: carpa (*Labeo rohita*), aceite de sardina (*Sardinella longiceps*), lisa (*Liza subviridis*) y en la macarela India (*Rastrelliger kanagurta*). Encontraron diferencias en la actividad lipasa en diferentes tejidos de éstos peces. La carpa mostró la mayor actividad en todos los tejidos en comparación con las otras tres especies de peces. Entre los tres grupos de tamaño de lisa, la lisa de tamaño medio mostró la más alta actividad que los otros dos grupos en todos los tejidos excepto el intestino. La lipasa hepatopancreática de la carpa exhibió mayor actividad hidrolítica sobre el aceite de sardina que la lipasa intestinal de la carpa.

Rivera-Santos, en 2003, purificó y caracterizó tripsina proveniente del tejido intestinal y ciego pilórico del chillo de ojo amarillo, *Lutjanus vivanus*. La enzima fue purificada diez veces mediante un proceso de precipitación con sulfato de amonio,

seguido por cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de afinidad. La enzima presentó actividad óptima a pH 8.0 y a 60°C. La tripsina fue parcial o completamente inhibida por el inhibidor de tripsina de soya (SBTI) a concentración de 0.1% o mayor. Mediante el análisis de la electroforesis SDS-PAGE de la proteína purificada se observó una banda sencilla con un peso molecular estimado de 26.1 kDa.

Castillo-Yáñez *et al.*, en 2004, llevaron a cabo la caracterización de enzimas proteolíticas acídicas provenientes de las vísceras de la sardina Monterrey (*Sardinops sagax caerulea*). La purificación de las enzimas se llevó a través de una serie de pasos que involucraron precipitación con sulfato de amonio, diálisis, centrifugación y cromatografía de intercambio iónico. Mediante éste estudio se encontró la principal actividad proteolítica en álcali (pH 10) y la menor actividad en ácido (pH 3). A partir de las proteasas acídicas purificadas se seleccionaron seis fracciones con alta actividad. Una fracción (42) mostró una banda en SDS-PAGE y dos bandas mediante isoelectroenfoque, con puntos isoeléctricos (pI) cercanos a 4.0 y 4.5, respectivamente. El pH para la actividad proteasa acídica fue 2.5, con alta estabilidad en el intervalo ácido y marcada pérdida de actividad a pH neutro y alcalino. La temperatura óptima fue de 45°C. las características de éstas enzimas asemejan aquellas de las enzimas digestivas de otros peces.

Castillo-Yáñez *et al.*, en 2005, llevaron a cabo la purificación y caracterización de tripsina proveniente del ciego pilórico de la sardina Monterrey *Sardinops sagax caerulea*. La enzima fue purificada mediante precipitación con sulfato de amonio, filtración en gel y cromatografías de afinidad y de intercambio iónico. La masa molecular de la tripsina recuperada fue de 25 kDa y mostró actividad específica

estearasa sobre el sustrato $N\alpha$ -p-tosil-L-arginina metil éster (TAME) que fue 4.5 veces mayor que la actividad específica amidasa sobre N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida. La enzima purificada fue parcialmente inhibida por el inhibidor serina-proteasa fenil-metil-fluoruro sulfonil y completamente por el inhibidor de tripsina de soya y la benzamidina pero no fue inhibida por el inactivador EDTA metalo-proteasa o el inhibidor quimiotripsina tosil-L-fenilalanina clorometil-cetona. El pH óptimo para la actividad enzimática fue 8.0 y la máxima estabilidad fue observada entre pH 7.0 y 8.0. Se observó una marcada pérdida de la estabilidad a un pH menor que 4.0 y mayor que 11.0. La actividad fue óptima a 50°C y se perdió actividad a temperaturas más altas.

En las investigaciones previas resaltan las enzimas tripsina y quimiotripsina como las más estudiadas, sin embargo, es conveniente la realización de estudios en los que se evalúen otras actividades enzimáticas, tales como carboxipeptidasa, aminopeptidasa, colagenasa y lipasa, entre otras enzimas digestivas, especialmente en el subproducto del procesamiento del pez (vísceras), para conocer la viabilidad de un proceso de purificación de éstas enzimas (a través del análisis de los rendimientos tanto de actividad como de proteína) a nivel industrial a partir del subproducto, ya que éste material se encuentra disponible en cantidades significativas y las enzimas tienen importantes aplicaciones industriales.

II.2 Estudios sobre producción y caracterización de hidrolizados proteicos de pescado

La mayoría del trabajo inicial en la hidrólisis de proteína de pescado fue llevada a cabo en los años 1960's, gran parte de éste en concentrado de proteína de pescado como un aporte nutritivo de proteína económica utilizada en países en desarrollo (Kristinsson y Rasco, 2000).

Kristinsson y Rasco (2000), llevaron a cabo un estudio para conocer las propiedades bioquímicas y funcionales de proteínas hidrolizadas (5, 10 y 15% grados de hidrólisis) provenientes del músculo del salmón del Atlántico (*Salmo salar*) con las proteasas alcalinas Alcalasa 2.4L, Flavourzyme 1000L, Corolasa PN-L y Corolasa 7089, o con proteasas digestivas endógenas. Las condiciones de reacción fueron controladas a pH 7.5, 40°C y un contenido de proteína del 7.5%. Las proteasas se inactivaron mediante calor, el material insoluble y que no fue hidrolizado se separó mediante centrifugación, y las fracciones de proteína soluble se recuperaron y liofilizaron. El contenido de proteína de los hidrolizados se encontró entre 77.7 hasta 88.4%, y el contenido de lípidos fue muy bajo. La recuperación de nitrógeno fue del 40.6 al 79.9%. El índice de solubilidad de nitrógeno fue comparable al de la albúmina de huevo y varió del 92.4 al 99.7%. La solubilidad fue alta en un amplio intervalo de pH. La capacidad emulsificante de los hidrolizados de proteína de pescado se encontró en el intervalo de 75-299 ml de aceite emulsificado por 200 mg de proteína, y algunos fueron mejores que el concentrado de proteína de soya (180 ml de aceite emulsificado por 200 mg de proteína), pero la albúmina de huevo tuvo la mayor capacidad emulsificante (417 ml de aceite emulsificado por 200mg de proteína). La

estabilidad de emulsificación para los hidrolizados de proteína de pescado (50-70%) fue similar a, o menor que, la de albúmina de huevo (73%) o el concentrado de proteína de soya (68%). La absorción de grasa fue mayor para los hidrolizados de proteína de pescado (3.22-5.90 ml de aceite/g de proteína) con grados de hidrólisis del 5 y 10% que para los hidrolizados del 15%, y todos tuvieron mayor absorción de grasa que la albúmina de huevo (2.36 ml de aceite/g de proteína) o que el concentrado de proteína de soya (2.90 ml de aceite/g de proteína).

Gilmartin y Jervis (2002), produjeron hidrolizados del músculo de bacalao (*Gadus morhua*), y determinaron la influencia de combinaciones de preparaciones de enzimas comerciales sobre el rango de tamaño del péptido hidrolizado, las cuales fueron determinadas usando sustratos fluorogénicos. Se usó alcalasa en combinación con preparaciones de otras enzimas comerciales (Neutrasa, Protamex, concentrado de proteasa alcalina, bromelaína, papaína, Corolasa 7089, Concentrado II de Validasa TSP y Validasa FP 60) para producir los hidrolizados del músculo de bacalao. Cada hidrolizado del músculo fue caracterizado con respecto al porcentaje del grado de hidrólisis (GH%), rango del peso molecular de los péptidos y el contenido de aminoácidos libres. Las preparaciones de enzimas que contenían predominantemente actividades proteasa o endopeptidasa alcanzaron elevados grados de hidrólisis y produjeron cantidades significativas de péptidos con un peso molecular menor que 3000. La alcalasa combinada con preparaciones ricas en exopeptidasa produjeron hidrolizados ricos en péptidos de bajo peso molecular. Se encontró que seleccionando las preparaciones de enzimas con perfiles de actividad complementarios, puede manipularse el perfil del peso molecular de los péptidos de los hidrolizados.

Aspmo *et al.* (2005), llevaron a cabo estudios sobre la solubilización de vísceras de bacalao (*Gadus mohua*). Las vísceras fueron hidrolizadas mediante enzimas endógenas o en combinación con una de siete diferentes preparaciones comerciales de proteasas (Alcalasa 2.4L, Neutrasa 0.8L, Protamex, Papaína, Bomelaína, Actinidina y una mezcla de proteasas de plantas). Las reacciones de hidrólisis fueron llevadas a cabo con vísceras recién descongeladas utilizando un gradiente inicial de temperatura y terminando a diferentes tiempos mediante inactivación por calor de las enzimas. Los hidrolizados fueron caracterizados con respecto a la materia seca soluble, turbidez, concentración de grupos α -amino y distribución del peso molecular de los péptidos. La Alcalasa y la Papaína dieron los resultados mayores de materia seca solubilizada, alcanzando hasta un 95% para los hidrolizados con altas concentraciones de Alcalasa. También se encontró que con la actividad de las enzimas endógenas fue suficiente para obtener un rendimiento de solubilización de más del 75% (en términos de materia seca solubilizada). Con éstos resultados se tiene que el rendimiento extra logrado mediante la adición de proteasas comerciales es limitado y no siempre es económicamente benéfico.

II.3 Estudios en subproducto del procesamiento de sardina

García-Sánchez y Márquez-Rocha (información no publicada) realizaron estudios en subproducto del procesamiento de sardina en los que evaluaron la recuperación de proteína y de actividad proteolítica a pH ácido y pH alcalino. La preparación del extracto crudo consistió en la trituración del subproducto, su homogenización, ajuste de pH (ácido y alcalino) y centrifugación para descartar el material no soluble. Los resultados mostraron que a pH alcalino (11.5) se logra la mayor recuperación de

proteína soluble y que en extractos de vísceras ajustados a este mismo pH se recupera la mayor cantidad de proteína con actividad proteolítica.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo general

Obtención de hidrolizados de subproductos de sardina mediante hidrólisis con enzimas purificadas de vísceras de sardina.

III.2 Objetivos específicos

1. Recuperación y purificación de proteasas y lipasas a partir de subproducto del procesamiento de sardina.
2. Obtención y caracterización de hidrolizados de subproducto de sardina catalizados por las enzimas proteasas purificadas.

III.3 Alcance del trabajo:

La investigación realizada en éste trabajo, presenta resultados obtenidos a nivel laboratorio, el cual es la base para el diseño de un proceso a nivel planta piloto y un posterior escalamiento a nivel industrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 Establecimiento del proceso utilizado para la purificación y caracterización de enzimas de subproducto de pescado.

El procedimiento desarrollado se presenta en la Figura 5.

IV.1.1 Organismo utilizado

Se utilizaron anchovetas *Engraulis mordax*, las cuales fueron obtenidas de un encierro rectangular flotante en el Muelle de Ensenada (Ensenada, México) el 10 de octubre de 2005. Las anchovetas fueron trasladadas vivas hasta CICESE en cubetas con bolsas que contenían agua de mar. Los organismos tuvieron una longitud promedio de 10.4 cm y un peso promedio de 5.94 g.

IV.1.2 Preparación del extracto crudo

Los ejemplares vivos de anchoveta fueron sacrificados y las vísceras obtenidas individualmente (se extrajeron el intestino completo, ciegos pilóricos, estómago y páncreas), se almacenaron en bolsas de polietileno a -70 °C, hasta su procesamiento. Se homogenizaron de vísceras en agua destilada fría en una relación 1:50 (vísceras:agua). Primeramente se trituraron en una licuadora RIVAL[®] durante 3 min haciendo pausas de 5 min en los que la solución permanecía a 0 °C cada vez que se completó 1 min de licuado. Posteriormente se utilizó un homogenizador PRO250[®] siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Enseguida se ajustó el pH a 11.5 con NaOH 0.2 N con agitación constante y en un baño de hielo. A

continuación se centrifugó a 20,000 x g durante 20 min a 2 °C. El sobrenadante fue considerado el extracto crudo.

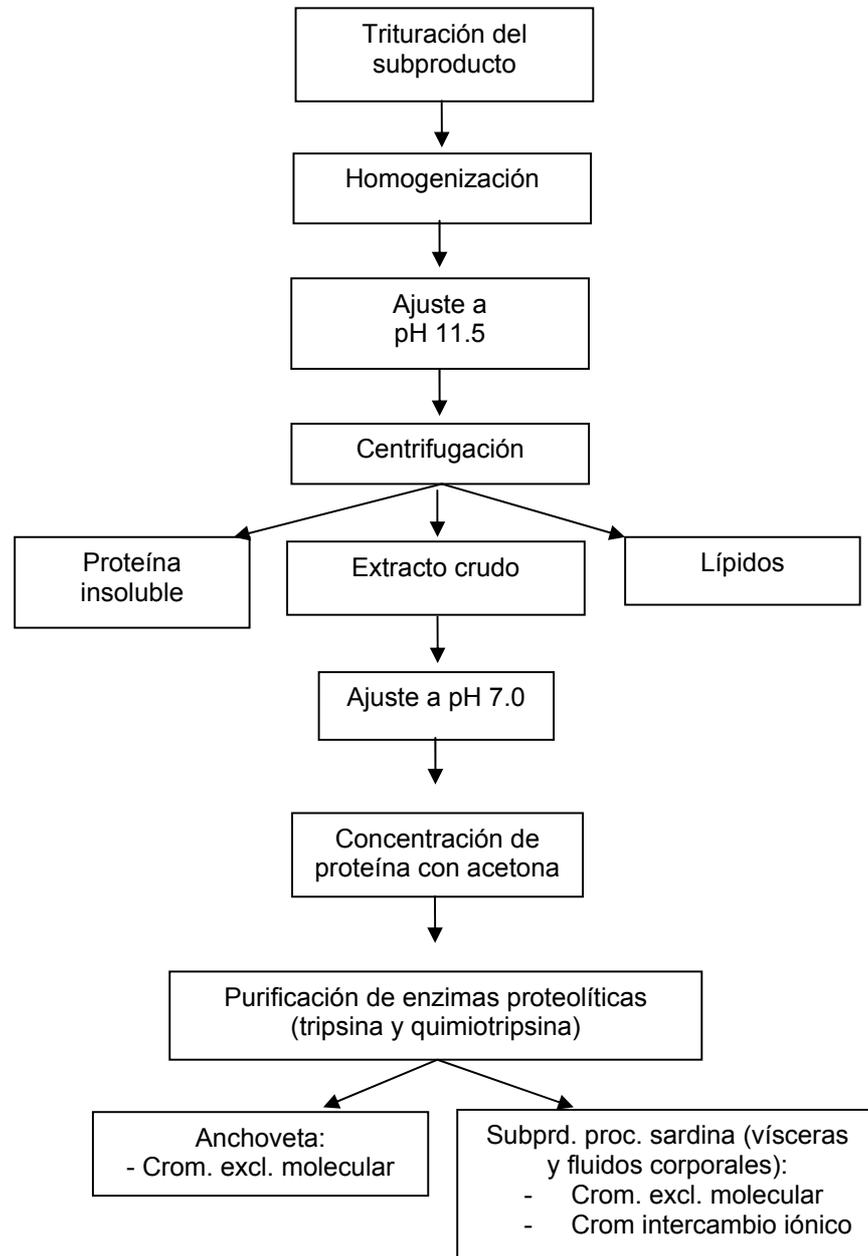


Figura 5. Estrategia experimental utilizada para la recuperación de proteína y purificación de enzimas proteolíticas tanto para las procedentes de vísceras de anchoveta *Engraulis mordax* como para las de subproducto del procesamiento de sardina.

IV.1.3 Precipitación de proteína

IV.1.3.1 Precipitación con sulfato de amonio

Este método se realizó de acuerdo a la metodología indicada en Rosenberg (1996) con las siguientes modificaciones: primeramente se ajustó a pH 7.0 con HCl 0.1 N una alícuota de extracto crudo conservando la temperatura lo más baja posible con un baño de hielo. Posteriormente se mezcló con la cantidad adecuada de sulfato de amonio según el porcentaje de saturación requerido. Se realizaron dos cortes: 0-80% y 80-90%. La solución se equilibró durante 4 h, después se centrifugó a 20,000 x g durante 20 min a 4 °C. Posteriormente se decantó el sobrenadante y el precipitado se redisolvió en una mínima cantidad de agua desionizada fría. Se determinaron proteína soluble y actividad proteolítica tanto del precipitado redisoluelto como del sobrenadante.

La cantidad de sulfato de amonio a adicionar a 1 L de extracto crudo para dar la saturación deseada se determinó a partir de la siguiente ecuación:

$$g = \frac{533 \times (S_2 - S_1)}{100 - (0.3 \times S_2)} \quad (1)$$

en donde S_1 es la concentración inicial, y S_2 es la concentración final. Esta ecuación considera el incremento en el volumen dado por la adición de sal.

IV.1.3.2 Precipitación con acetona

Este método se realizó de acuerdo a la metodología indicada en Rosenberg (1996) con las siguientes modificaciones: se ajustó a pH 7.0 con HCl 0.1 N una alícuota de

extracto crudo. Enseguida se mezcló con la cantidad adecuada de acetona según el corte a realizar (0-50% y 50-70%). A continuación se incubó la mezcla a -20 °C durante 15 min. El material precipitado se recolectó mediante centrifugación en un rotor preenfriado a 4 °C a 6,000 x g durante 20 min. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se redisolvió en una mínima cantidad de agua desionizada fría. Se determinaron proteína soluble y actividad proteolítica tanto del precipitado redisoluelto como del sobrenadante.

La fórmula utilizada para calcular el volumen de acetona necesario es:

$$\text{Volumen a agregar a 1 L para tomar \% desde } x \text{ hasta } y = \frac{1,000 \times (y - x)}{100 - y} \text{ ml} \quad (2)$$

IV.1.3.3 Precipitación con TCA-acetona

Se ajustó una alícuota de extracto crudo a pH 7.0 con HCl 0.1 N. Posteriormente se mezclaron TCA (ácido tricloroacético) al 10% en acetona (frío) con el extracto crudo en una proporción 3:1. Se mezcló con vórtex y se incubó a -20 °C durante 12 h. Enseguida se centrifugó a 15,000 x g durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se agregó acetona fría en una proporción 1:1 (acetona:extracto crudo). Se mezcló con vórtex y se incubó a -20 °C durante 30 min. A continuación se centrifugó a 15,000 x g durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se permitió que los precipitados se secaran al aire. El precipitado se redisolvió en una mínima cantidad de agua desionizada fría. Se determinaron proteína soluble y actividad proteolítica del precipitado redisoluelto y del sobrenadante.

IV.1.3.4 Precipitación con metanol-cloroformo

Este método se realizó de acuerdo a la metodología indicada en Rosenberg (1996) con las siguientes modificaciones: se agregaron 0.4 ml de metanol a 0.485 ml de extracto crudo previamente ajustado a pH 7.0 con HCl 0.1 N. se mezcló con vórtex y se centrifugó a 12,000 x g durante 10 s a 4 °C. Enseguida se agregaron 0.1 ml de cloroformo, se mezcló con vórtex y se centrifugó a 12,000 x g durante 10 s a 4 °C. A continuación se agregaron 0.3 ml de agua destilada fría, se mezcló con vórtex y se centrifugó a 12,000 x g durante 1 min a 4 °C. Enseguida se adicionaron 0.3 ml de metanol a la fase inferior (fase de cloroformo). Se mezcló y centrifugó a 13,000 x g durante 4 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se redisolvió en un volumen mínimo de agua desionizada fría. Se determinó proteína soluble y actividad proteolítica del precipitado rediseuelto así como del sobrenadante.

IV.1.4 Procedimiento de purificación de enzimas proteolíticas de vísceras de anchoveta

Se mezclaron 60 ml extracto crudo previamente ajustados a pH 7.0 con HCl 0.1 N. Enseguida se mezclaron con 140 ml de acetona para realizar un corte de 0-70%. A continuación se incubó la mezcla a -20 °C durante 15 min. El material precipitado se recolectó mediante centrifugación en un rotor preenfriado a 4 °C a 6,000 x g durante 20 min (Rosenberg, 1996). Se decantó el sobrenadante y el precipitado se redisolvió en 3.5 ml de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 0.5 M frío (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005). El precipitado rediseuelto (0.3 ml) se pasó por una columna de cromatografía de exclusión por tamaño de 1 x 20 cm que contenía Sephadex G-75. Se utilizó Tris-HCl

50 mM, pH 7.5, NaCl 0.5 M como fase móvil a una velocidad de flujo de 0.25 ml/ min, se colectaron 30 fracciones de 1.5 ml cada una.

IV.2 Purificación de enzimas de subproducto del procesamiento de sardina

IV.2.1 Obtención de la materia prima

Todas las muestras de subproducto de procesamiento de sardina fueron proporcionadas por Productos Marinos ABC S.A. de C.V. (Ensenada, México) el 19 de octubre de 2005. Las muestras fueron entregadas congeladas en bolsas de polietileno. El subproducto fue colocado entre capas de hielo y trasladado hasta el laboratorio de CICESE en Ensenada en donde se conservó a -20 °C hasta su utilización.

IV.2.2 Preparación de extractos crudos de vísceras y fluidos corporales y de cabeza, cola y vísceras

La preparación de los extractos crudos se llevó a cabo según García-Sánchez y Márquez-Rocha (información no publicada), con modificaciones.

IV.2.2.1 Vísceras y fluidos corporales

Una vez que se descongeló una muestra de vísceras estas fueron cortadas con una licuadora RIVAL[®] hasta lograr una consistencia uniforme. Enseguida se pesó una cantidad de subproducto, se agregó agua destilada en una relación 1:1 y se homogenizó el material en un homogenizador PRO250[®] durante 5 min utilizando un baño de hielo. Enseguida se ajustó el pH a 11.5 con NaOH 0.2 N con agitación constante y en un baño de hielo a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 15,000 x g

durante 45 min a 4 °C. Al término se descartó la fase lipídica y se recuperó el sobrenadante el cual fue considerado el extracto crudo.

IV.2.2.2 Cabeza, cola y vísceras

Primeramente se descongelaron (a 4 °C) 2 kg de subproducto los cuales fueron eviscerados y pesados por separado 1) las cabezas y colas, 2) las vísceras y 3) la sangre y fluidos corporales con la finalidad de conocer la proporción de cada uno de ellos. Enseguida el material fue cortado con una licuadora RIVAL[®] hasta lograr una consistencia homogénea. Posteriormente se pesó una muestra de subproducto licuado y se agregó agua destilada en una relación 1:2 (subproducto:agua). Enseguida se homogenizó el material en un homogenizador PRO250[®] durante 5 min utilizando un baño de hielo. Se ajustó el pH a 11.5 con NaOH 0.2N con agitación constante y en un baño de hielo a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 15,557 x g durante 50 min a 4 °C. Al término se descartó la fase lipídica y se recuperó el sobrenadante el cual fue considerado el extracto crudo.

IV.2.3 Procedimiento de purificación de enzimas proteolíticas de subproducto del procesamiento de sardina (vísceras y fluidos corporales)

Se mezclaron 90 ml de extracto crudo de vísceras y fluidos corporales previamente ajustados a pH 7.0 con HCl 0.2 N. Enseguida se mezclaron con 210 ml de acetona para realizar un corte de 0-70%. A continuación se incubó la mezcla a -20 °C durante 15 min. El material precipitado se recolectó mediante centrifugación en un

rotor preenfriado a 4 °C a 6,000 x g durante 20 min. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se redisolvió en una mínima cantidad de solución amortiguadora A (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 0.5 M) y se depositó 1 ml de precipitado redissuelto en una columna de exclusión molecular de 1 x 3 cm con Sephadex G-75, se usó la solución amortiguadora A como fase móvil a una velocidad de flujo de 0.25 ml/min y se colectaron 5 fracciones de 1 ml cada una (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005). Las fracciones obtenidas fueron concentradas con acetona agregando nueve volúmenes de acetona enfriada a -20 °C a la solución proteica e inmediatamente después de mezclar se incubó a -20 °C durante 20 min. La proteína precipitada se colectó mediante centrifugación a 12,000 x g, 5 min, 4 °C (Rosenberg, 1996). El precipitado se redisolvió en un mínimo volumen de solución amortiguadora A y se depositó en una columna de intercambio iónico de 1 x 7 cm con DEAE-celulosa equilibrada con solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM, pH 7.5. La proteína que no fue absorbida se lavó con solución amortiguadora, y la columna fue eluída con un gradiente lineal de 10 ml de NaCl desde 0 hasta 0.3 M a una velocidad de flujo de 0.25 ml/min y se colectaron 30 fracciones de 1.5 ml cada una (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005). Las fracciones 3, 4 que mostraron mayor actividad quimiotripsina y 28 que mostró mayor actividad tripsina fueron concentradas con acetona agregando nueve volúmenes de acetona enfriada a -20 °C a la solución proteica e inmediatamente después de mezclar se incubó a -20 °C durante 20 min. La proteína precipitada se colectó mediante centrifugación a 12,000 x g, 5 min, 4 °C (Rosenberg, 1996). El precipitado se redisolvió en una cantidad mínima de solución amortiguadora A.

Debido a los resultados de rendimiento obtenidos en la purificación de enzimas proteolíticas tanto en anchoveta como en sardina, se optó por preparar dos grupos de extractos de subproducto del procesamiento de sardina: 1) vísceras y fluidos corporales y 2) cabeza, cola y vísceras, concentrar la proteína soluble presente en los extractos utilizando acetona y hacer la caracterización parcial enzimática de los extractos en cada paso de su preparación (sin llevar a cabo ningún tipo de cromatografía) (véanse las secciones V.1.2 y V.3) de acuerdo a la estrategia experimental presentada en la Figura 6.

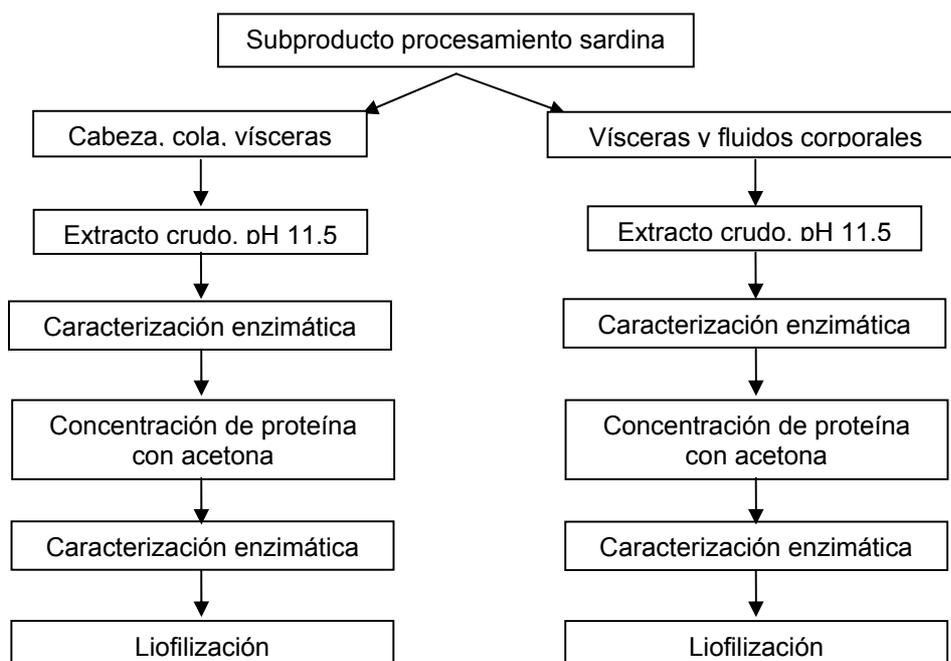


Figura 6. Estrategia experimental para la obtención de concentrados de enzimas proteolíticas procedentes del subproducto del procesamiento de sardina para ser utilizados en la preparación de hidrolizados de subproducto del procesamiento de sardina.

IV.3 Caracterización enzimática parcial

IV.3.1 Cuantificación de actividad proteolítica

La actividad proteolítica se evaluó acuerdo a González-Agráz (2000) con las siguientes modificaciones: las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C utilizando 0.5 ml de azocaseína al 1% como sustrato en 0.5 ml de Tris-HCl, pH 7.5 y una alícuota de muestra convenientemente diluida. La reacción inició con la adición de muestra y se detuvo 10 min después mediante la adición de 0.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10% e inmediatamente después se incubó a 0 °C durante 10 min. La mezcla de reacción se centrifugó en tubos Eppendorf durante 5 min a 10,000 x g. Se separó el sobrenadante del sustrato que no fue digerido y se midió la absorbancia a 366 nm. El control negativo fue preparado adicionando TCA antes de agregar la alícuota de extracto crudo. La actividad proteolítica se expresó como un cambio de absorbancia (1 Δ Abs) a 366 nm por min en el extracto crudo bajo las condiciones del ensayo usando un espectrofotómetro HACH[®], mediante la ecuación (3).

$$\frac{U}{\text{mg de proteína}} = \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min})(\text{Vol. final de reacción})}{(\text{mg de proteína})} \quad (3)$$

IV.3.2 Tripsina

La actividad tripsina fue evaluada de acuerdo a Castillo-Yáñez *et al.*, (2005) con las siguientes modificaciones: para la evaluación se mezclaron directamente en una celda de cuarzo una alícuota de muestra convenientemente diluida con 0.1 ml de Tris-HCl 0.5 M, pH 7.5, 0.1 ml de CaCl₂ 0.2 M, una alícuota de BAPNA 0.02 M en

dimetil sulfóxido (DMSO) de acuerdo a la dilución de la muestra, y se ajustó a un volumen final de reacción de 1 ml con agua destilada. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C. Se definió 1 unidad de actividad como la producción de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de *p*-nitroanilida, la cual se midió mediante el monitoreo del incremento en $\text{Abs}_{410 \text{ nm}}$ cada 5 s durante 1 min en un espectrofotómetro HACH®. Las unidades por miligramo de proteína (U/mg de proteína) de hidrólisis de BAPNA fueron calculadas con la ecuación (4).

$$\frac{U}{\text{mg de proteína}} = \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min})(1,000)(\text{Vol. final de reacción})}{(8,800)(\text{mg de proteína})} \quad (4)$$

en donde 8,800 corresponde al coeficiente de extinción molar de la *p*-nitroanilida en unidades de $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

IV.3.3 Quimiotripsina

La actividad quimiotripsina fue evaluada de acuerdo a Castillo-Yáñez *et al.*, (2005) con las siguientes modificaciones: se mezclaron en una celda de cuarzo una alícuota de muestra convenientemente diluida con 0.1 ml de Tris-HCl 0.5 M, pH 7.5, 0.1 ml de CaCl_2 0.2 M, una alícuota de SAPNA 0.001 M en DMSO de acuerdo a la dilución de la muestra, y se ajustó a un volumen final de reacción de 1 ml con agua destilada. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C. Se definió 1 unidad de actividad como la producción de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de *p*-nitroanilida, la cual se midió mediante el monitoreo del incremento en $\text{Abs}_{410 \text{ nm}}$ cada 5 s durante 1 min en un espectrofotómetro HACH®.

Las unidades por miligramo de proteína (U/mg de proteína) de hidrólisis de SAPNA fueron calculadas con la ecuación (4).

IV.3.4 Aminopeptidasa

La actividad aminopeptidasa se midió de acuerdo a Donovan *et al.*, (2004) con las siguientes modificaciones: en una celda de cuarzo se mezclaron una alícuota de muestra convenientemente diluida con 0.1 ml de Tris-HCl 0.5 M, pH 7.5, un volumen adecuado de Ala-*p*-nitroanilida 0.02 M en Tris-HCl 0.5 M, pH 7.5, 30 °C según la dilución de la muestra y se ajustó un volumen final de reacción de 1 ml con agua destilada. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C. Se definió 1 unidad de actividad como la producción de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de *p*-nitroanilida, la cual se midió mediante el monitoreo del incremento en $\text{Abs}_{410 \text{ nm}}$ cada 5 s durante 1 min en un espectrofotómetro HACH[®]. Las unidades por miligramo de proteína (U/mg de proteína) de hidrólisis de Ala-*p*-nitroanilida fueron calculadas con la ecuación (4).

IV.3.5 Pepsina

La actividad pepsina se evaluó de acuerdo a Donovan *et al.*, (2004) con las siguientes modificaciones: en microtubos Eppendorf de 1.5 ml se mezclaron 0.5 ml de hemoglobina al 0.5 % en HCl 0.06 M, pH 2.0 y 0.015 ml de muestra a 30 °C. La reacción inició con la adición de la muestra y se detuvo 30 min después mediante la adición de 0.5 ml de TCA al 10% e inmediatamente después se incubó a 0 °C durante 10 min. La mezcla de reacción se centrifugó durante 10 min a 4,500 x g. Se separó el sobrenadante del sustrato que no fue digerido y se midió la absorbancia a

280 nm. El control negativo fue preparado adicionando TCA antes de agregar la muestra. Se definió 1 unidad de actividad como la producción de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de tirosina en un espectrofotómetro HACH[®], la cual se midió con la siguiente ecuación:

$$\frac{U}{\text{mg de proteína}} = \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min})(1,000)(\text{Vol. final de reacción})}{(1,449.6)(\text{mg de proteína})} \quad (5)$$

en donde 1,449.6 corresponde al coeficiente de extinción molar de tirosina en unidades de $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

IV.3.6 Carboxipeptidasa A

La actividad carboxipeptidasa A se midió de acuerdo a González-Agráz (2004) con las siguientes modificaciones: en una celda de cuarzo se mezclaron 0.89 ml de agua destilada, 0.1 ml de hippuril-L-phe 0.001 M en Tris-HCl 0.025 M, pH 7.5, 30 °C, NaCl 0.1 M y 0.01 ml de solución proteica en NaCl 1.0 M. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C. Se definió 1 unidad de actividad como la producción de 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de ácido hipúrico, la cual se midió mediante el monitoreo del incremento en $\text{Abs}_{254 \text{ nm}}$ cada 5 s durante 1 min en un espectrofotómetro HACH[®]. Las unidades por miligramo de proteína (U/mg de proteína) de hidrólisis de hippuril-L-phe fueron calculadas con la siguiente ecuación:

$$\frac{U}{\text{mg de proteína}} = \frac{(\Delta\text{Abs}/\text{min})(1,000)(\text{Vol. final de reacción})}{(360)(\text{mg de proteína})} \quad (6)$$

en donde 360 corresponde al coeficiente de extinción molar del ácido hipúrico en unidades de $M^{-1}\cdot cm^{-1}$.

IV.3.7 Carboxipeptidasa B

La actividad carboxipeptidasa B se evaluó de acuerdo a González-Agráz (2004) con las siguientes modificaciones: en una celda de cuarzo se mezclaron 0.75 ml de agua destilada, 0.25 ml de hippuril-L-arg 0.001 M en Tris-HCl 0.025 M, pH 7.5, 30 °C, NaCl 0.5 M y 0.007 ml de solución proteica. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C. Se definió 1 unidad de actividad como la producción de 1 $\mu mol/min$ de ácido hipúrico, la cual se midió mediante el monitoreo del incremento en $Abs_{254\text{ nm}}$ cada 5 s durante 1 min en un espectrofotómetro HACH[®]. Las unidades por miligramo de proteína (U/mg de proteína) de hidrólisis de hippuril-L-arg fueron calculadas con la ecuación (6).

IV.3.8 Colagenasa

La actividad colagenasa se determinó cualitativamente. El sustrato se preparó de la siguiente forma: en un recipiente Pyrex[®] se calentaron a 95 °C 360 ml de agua destilada a los que se agregaron 7.2 g de grenetina Knox[®] con temperatura y agitación constantes hasta que la grenetina se disolvió completamente. Enseguida se vertieron 15 ml de la solución de grenetina en vasos de poliestireno con capacidad de 30 ml, se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que se observó una consistencia firme. Para la realización del ensayo se depositaron 0.03 ml de muestra en la superficie del sustrato, se hicieron observaciones cada 30 min hasta completar

180 min. El blanco consistió en agregar agua destilada en lugar de muestra. El ensayo se tomó como positivo al observar la formación de una cavidad en el sustrato en el lugar en donde se depositó la muestra.

IV.3.9 Lipasa

La actividad lipasa se determinó de acuerdo a Yang *et al.*, (2002) con las siguientes modificaciones: en microtubos Eppendorf de 1.5 ml se mezclaron 0.48 ml de *p*-nitrofenil acetato 0.0005 M en Tritón X-100 al 0.5% en fosfato de potasio 0.025 M, pH 7.0, 37 °C con 0.02 ml de solución proteica convenientemente diluida según fue necesario. La reacción inició con la adición de la solución proteica y se detuvo 60 min después mediante la adición de 0.5 ml de 1-propanol e inmediatamente se midió la absorbancia a 405 nm. El blanco fue preparado adicionando 1-propanol antes de agregar la solución proteica. La actividad lipasa se expresó como la producción de 1 μ mol/min de *p*-nitrofenol a 405 nm bajo las condiciones del ensayo usando un espectrofotómetro HACH[®], mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{U}{\text{mg de proteína}} = \frac{(\Delta Abs / \text{min})(1,000)(Vol. \text{ final de reacción})}{(17,800)(\text{mg de proteína})} \quad (7)$$

en donde 17,800 corresponde al coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol en unidades de $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

IV.4 Producción de hidrolizados de subproducto del procesamiento de sardina

La estrategia experimental seguida para la producción de hidrolizados se muestra en la Figura 7.

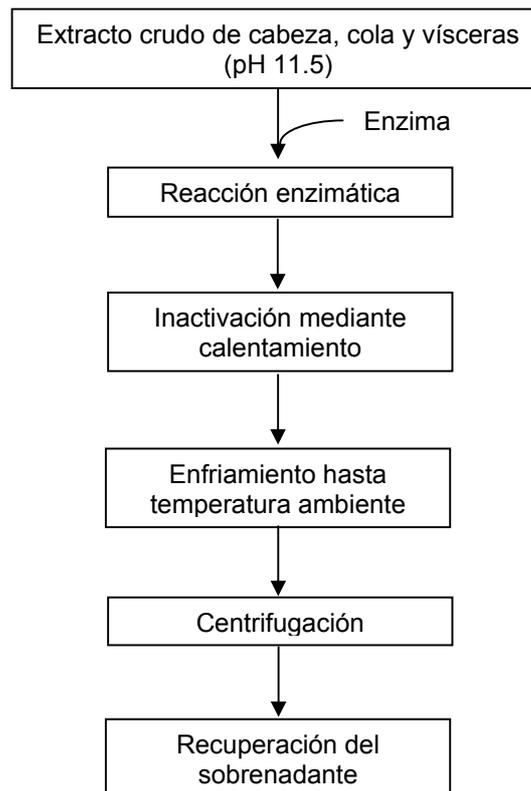


Figura 7. Proceso de hidrólisis enzimática para la producción de hidrolizados proteicos de subproducto del procesamiento de sardina.

IV.4.1 Preparación del sustrato

El sustrato fue preparado de la forma descrita en la sección IV.2.2.2.

IV.4.2 Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática del subproducto del procesamiento de sardina se llevó a cabo usando alcalasa, concentrado enzimático de vísceras y fluidos corporales y concentrado enzimático de cabeza, cola y vísceras. Las enzimas se agregaron con base en la cantidad de proteína presente en el sustrato, utilizando una relación enzima/sustrato del 25% (p/p), esto es, por cada 100 mg de proteína presentes en el sustrato se agregaron 25 mg de enzima. Las enzimas endógenas contenidas en el sustrato fueron usadas activamente durante todas las hidrólisis. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado en tubos de 2 ml para centrífuga marca Eppendorf® a una temperatura de 30 °C (la misma temperatura a la que se hicieron los ensayos de actividad enzimática) en un volumen de reacción de 1 ml durante 312 min con agitación manual ocasional. Transcurrido éste tiempo se detuvieron las reacciones transfiriendo los tubos a un baño a 95 °C durante 15 min. Posteriormente, se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. Enseguida se centrifugó a 15,000 x g durante 15 min a 4 °C, se recuperó el sobrenadante (Kristinsson y Rasco, 2000, Gilmartin y Jervis, 2002, Estrada-Corona, 2002 y Aspino *et al*, 2005) y se separaron alícuotas para caracterización molecular. Tanto el sobrenadante como las alícuotas se almacenaron a -20 °C. Para determinar los grupos alfa-amino al tiempo cero (NH_{2t0}) (véase IV.4.3) se utilizaron tubos que fueron transferidos a un baño a 95 °C durante 15 min inmediatamente después de agregar la enzima.

IV.4.3 Determinación del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis se determinó usando la técnica del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) de acuerdo a Adler-Nissen (1979) y Estrada-Corona (2002) de la siguiente forma: se tomaron por triplicado alícuotas de 0.064 ml de muestra diluida 1:100 y se depositaron en frascos ámbar de 7 ml, enseguida se adicionaron 1 ml de solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.2 M, pH 8.2 y 0.5 ml de TNBS al 0.05% (fresco). Las reacciones se llevaron a cabo en un baño de agua a 50 °C durante 60 min (protegiendo de la luz cubriendo el baño de agua con papel aluminio). Se establecieron como blanco los frascos a los que se les agregó agua destilada en lugar de muestra. Transcurrido éste tiempo se detuvieron las reacciones al agregar 1 ml de HCl 0.1 N. Las mezclas de reacción se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente durante 15 min envueltas en una bolsa negra (para aislar de la luz). Posteriormente se leyó la absorbancia a 420 nm. El grado de hidrólisis se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$GH = \left(\frac{\text{grupos } \alpha - NH_{2t} - \text{grupos } \alpha - NH_{2t_0}}{\text{grupos } \alpha - NH_{2\max} - \text{grupos } \alpha - NH_{2t_0}} \right) (100) \quad (8)$$

en donde GH = grado de hidrólisis, $\text{grupos } \alpha - NH_{2t}$ = grupos α -amino en un tiempo dado, $\text{grupos } \alpha - NH_{2t_0}$ = grupos α -amino al tiempo cero de la hidrólisis, $\text{grupos } \alpha - NH_{2\max}$ = grupos α -amino debidos a hidrólisis ácida total. Los grupos α -amino se determinaron a partir de una curva estándar de L-leucina (véase Apéndice I).

La hidrólisis ácida total se llevó a cabo de acuerdo a Estrada-Corona (2002) por triplicado, en un tubo Pyrex de 15 ml se depositaron 0.5 ml de extracto crudo (sustrato) y se le adicionaron 4.5 ml de HCl 6 N, se desplazó el O₂ con N₂ e inmediatamente se cerraron los tubos, la hidrólisis se llevó a cabo durante 24 horas a 100 °C. La reacción se detuvo agregando 4.5 ml de NaOH 6 N. La mezcla de reacción se filtró para eliminar las cenizas, enseguida se determinaron los grupos α-amino de la forma descrita en la presente sección.

IV.4.4 Cromatografía de exclusión molecular-HPLC / distribución de pesos moleculares

La distribución de pesos moleculares de los hidrolizados obtenidos fueron determinados mediante cromatografía de exclusión molecular acoplada a cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés) usando una columna ZORBAX Bio Series GF-250 (Agilent). La fase móvil consistió en solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.018 M, pH 7.0 NaCl 0.13 M. La velocidad de flujo fue 1 ml/min. La absorbancia se monitoreó a 210, 214, 220, 230 y 254 nm, se utilizaron los valores a 254 nm y el tiempo de corrida fue de 15 min.

Se realizó una curva estándar de pesos moleculares de proteínas y péptidos usando albúmina de suero bovino (66,430 Da), cloroperoxidasa (42,000 Da), tripsina tipo IX (23,800 Da), ribonucleasa A (13,700 Da) y Ala-*p*-nitroanilida (245.7 Da). Esto produjo una correlación casi lineal entre el tiempo de retención y el ln del peso molecular de los péptidos (véase Apéndice II).

IV.5 Otros procedimientos analíticos

IV.5.1 Cuantificación de proteína soluble

Se utilizó el método de Bradford (Rosenberg, 1996) para cuantificar la cantidad de proteína soluble en cada paso realizado en el presente trabajo. Se usó albúmina de suero bovino (0.2 mg/ml) como estándar (véase Apéndice III).

IV.5.2 Análisis proximal de los extractos de vísceras y fluidos corporales

Con la finalidad de determinar la recuperación de proteína soluble y la eliminación de lípidos lograda a través de la metodología de preparación de extractos descrita en el presente trabajo se realizó un análisis proximal¹ de la materia prima (vísceras y fluidos corporales) así como del extracto preparado.

IV.5.3 Liofilización

Los extractos concentrados con acetona fueron liofilizados utilizando un equipo liofilizador marca Labconco[®]. Se colocaron aproximadamente 30 ml de material en tubos Eppendorf de 50 ml cubiertos con Parafilm[®] con pequeñas perforaciones. El procedimiento de liofilización se llevó a cabo durante 96 h.

IV.6 Análisis estadístico de los resultados

Para determinar diferencias significativas en los valores promedio de los experimentos realizados por triplicado: caracterización enzimática parcial de los concentrados de vísceras y fluidos corporales y de cabeza, cola y vísceras,

¹ El análisis fue realizado por SALIP Laboratorio Industrial y de Control, S. de R. L. de C. V. Carretera Ensenada-Tecate km 103, El Sauzal de Rodríguez, Ensenada, Baja California, 22760. Tel.: 174-67-63; tel./fax: 174-60-35.

determinación del grado de hidrólisis y la distribución de pesos moleculares; se usó la prueba estadística “t” de Student. El nivel de significancia fue determinado al 99% de probabilidad. Para el procesamiento de los datos y análisis estadístico se utilizaron los programas de computadora Stats v1.1 y Microsoft EXCEL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1 Establecimiento del proceso para la obtención y caracterización de enzimas

V.1.1 Evaluación de las técnicas de precipitación de proteína

El presente trabajo comenzó con la evaluación de diferentes métodos de concentración de enzima, es importante destacarlo, puesto que en la mayor parte de la literatura consultada se utiliza sulfato de amonio para concentrar proteína antes de utilizar cualquier técnica cromatográfica (Murakami y Noda, 1981, Noda y Murakami, 1981, Olivas-Burrola *et al.*, 2001, Rivera-Santos, 2003, Castillo-Yáñez *et al.*, 2004 y Castillo-Yáñez *et al.*, 2005). Se ha reportado que las vísceras de pescado son una rica fuente de diferentes enzimas que pueden tener algunas propiedades únicas de interés tanto para investigación como para uso industrial (Olivas-Burrola *et al.*, 2001). Las siguientes características fueron utilizadas para la descripción de la actividad enzimática: (1) contenido proteico y (2) actividad proteolítica usando un sustrato general para proteasas, azocaseína. Con respecto a la evaluación de los métodos de precipitación utilizados, los parámetros considerados fueron: (1) aumento de la concentración de proteína soluble y (2) aumento de la actividad proteolítica con respecto al extracto crudo. Los resultados fueron los siguientes (Tabla I): la precipitación con acetona y con TCA-acetona permiten obtener un mayor rendimiento de actividad siendo de 24.53 y 8.37%, respectivamente. Sin embargo, la precipitación con TCA-acetona proporciona el menor rendimiento de proteína (1.99%) y uno de los mayores factores de purificación (4.11) junto con acetona (4.09). Esto indica que la proteína precipitada con éste método corresponde en su

Tabla I. Resultados de los diferentes métodos de precipitación utilizados para concentrar enzimas proteolíticas de vísceras de anchoveta (*Engraulis mordax*).

Método	Proteína, mg·g víscera ⁻¹	Actividad proteolítica, U·g víscera ⁻¹	Act. prot., U·mg proteína ⁻¹	Factor de purific.	Rend. de actividad, %	Rend. de proteína, %
Extracto crudo	8.53	20.42	1.57	1	100	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.56	0.89	1.05	0.67	4.36	6.57
Acetona	0.51	5.01	6.42	4.09	24.53	5.99
TCA- acetona	0.17	1.71	6.45	4.11	8.37	1.99
Metanol- cloroformo	0.39	0.28	0.48	0.31	1.37	4.57

mayoría a proteína con actividad proteolítica. No obstante, debido a que éste método proporcionó muy bajo rendimiento de proteína se descartó para continuar con el siguiente paso de purificación. La precipitación con sulfato de amonio dio el mayor rendimiento de proteína (6.57%) pero el rendimiento de actividad es el segundo menor (4.36%) y el factor de purificación también es el segundo menor (0.67). Lo anterior indica que la mayoría de la proteína precipitada no posee actividad proteolítica lo cual eliminó éste método para continuar con el siguiente paso de purificación. En la precipitación con metanol-cloroformo se obtuvo un rendimiento de proteína del 4.57% y el menor rendimiento de actividad (1.37%) de todos los métodos utilizados, esto debido a que se precipitó muy poca proteína con actividad proteolítica. Dadas las razones anteriores éste método también se descartó para continuar con el siguiente paso de purificación. Finalmente, mediante la precipitación con acetona se alcanzó el segundo mejor rendimiento de proteína (5.99%) 0.58 veces menor que el mayor rendimiento de proteína obtenido con sulfato de amonio (6.57). Además, el rendimiento de actividad fue tres veces mayor (24.53%) que el

segundo mejor (8.37%, con TCA-acetona) y el factor de purificación fue de 4.09, un valor muy cercano a 4.11 alcanzado con TCA acetona, los cuales fueron los mayores.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Michail *et al.* (2006) quienes purificaron parcialmente enzimas proteolíticas de cabezas de trucha (*Salmo gairdnerii*) utilizando acetona, con lo que lograron un 99% de recuperación de proteína de interés comparado con las purificaciones parciales logradas con sulfato de amonio.

Cabe destacar que el factor de purificación logrado al precipitar con acetona es 3 veces mayor al reportado en trabajos en los que se precipita con sulfato de amonio (Olivas-Burrola *et al.*, 2001 y Castillo-Yáñez *et al.*, 2005).

Una característica importante al precipitar proteína con acetona es que ésta es completamente miscible en agua y que no reacciona con las proteínas. El TCA, por su parte, puede provocar en algunos casos que las proteínas precipitadas sean difíciles de redisolverse completamente (Rosenberg, 1999).

V.1.2 Purificación de enzimas proteolíticas presentes en vísceras de anchoveta

Al purificar tripsina y quimiotripsina mediante cromatografía de exclusión molecular a partir de vísceras de anchoveta, se obtuvo un patrón de elusión que formó un pico integrado por las fracciones 7-13, siendo la fracción 9 la que mostró mayor actividad proteolítica total (Figura 8).

Las fracciones 10 y 13 (Tablas II y III) mostraron la mayor actividad tripsina y quimiotripsina, en contraste con lo encontrado en el patrón de elusión (Figura 8) que

indica que la fracción 9 es la que tiene mayor actividad proteolítica, aunque ambas fracciones (10 y 13) están dentro del pico con mayor actividad.

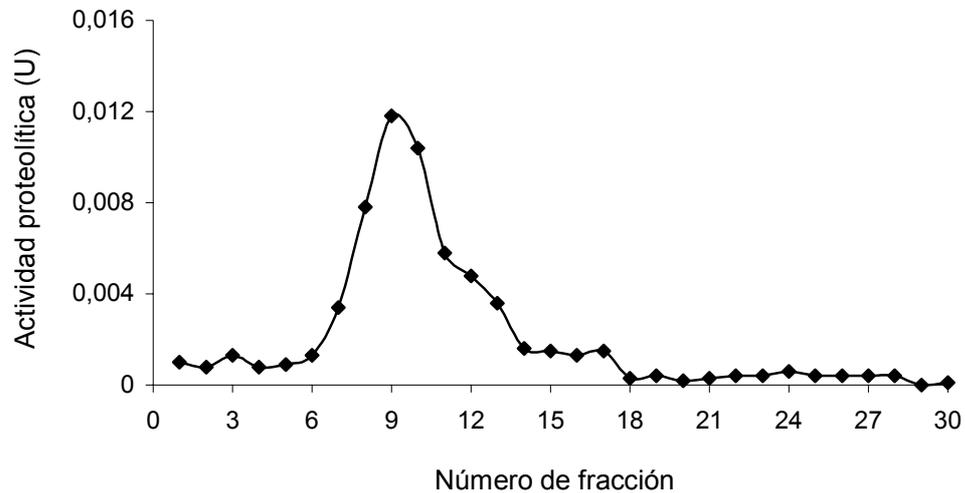


Figura 8. Actividad proteolítica de las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular del extracto de vísceras de anchoveta concentrado con acetona (0-70%). Elución con Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 0.5 M. Una unidad de actividad proteolítica se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μ mol de grupos azo a partir de azocaseína por minuto bajo las condiciones de ensayo.

Esto es razonable considerando que al utilizar azocaseína como sustrato se miden solamente los grupos azo liberados mediante la hidrólisis con diferentes enzimas contenidas en el extracto y no otros enlaces que hayan sido hidrolizados y que no estaban unidos a un grupo azo. Los resultados de actividad quimiotripsina (7.59 y 8.69 U/mg de proteína para las fracciones 10 y 13, respectivamente) son buenos tal como lo demuestran los factores de purificación obtenidos (7.91 y 9.05, respectivamente), sin embargo, los rendimientos de actividad son muy bajos (0.17%

y 0.38%, respectivamente), al igual que el rendimiento de proteína (0.13 para la fracción 10 y 0.04 para la fracción 13) (Tabla III).

Tabla II. Purificación de enzimas proteolíticas de vísceras de anchoveta *Engraulis mordax*.

Fracción	Proteína mg·g vísc ⁻¹	Actividad proteolítica, U·g vísc ⁻¹	Actividad proteolítica, U·mg prot ⁻¹	Rend. act. proteolítica, %	Factor purific. proteasas	Rend. proteína, %
Extracto crudo	5.51	14.55	2.64	100	1	100
Acetona	0.67	4.09	6.15	28.11	2.33	12.16
Exclusión molecular						
Fracc. 10	0.007	0.14	21.33	0.96	8.08	0.13
Fracc. 13	0.002	0.049	23.53	0.34	8.91	0.04

Tabla III. Caracterización parcial de enzimas proteolíticas de vísceras de anchoveta *Engraulis mordax*.

Fracción	Tripsina				Quimiotripsina			
	Actividad, U·g vísc ⁻¹	Actividad, U·mg prot ⁻¹	Rend. de act., %	Factor de purific.	Actividad, U·g vísc ⁻¹	Actividad, U·mg prot ⁻¹	Rend. de act. %	Factor de purific.
Extracto crudo	2.38	0.43	100	1	5.29	0.96	100	1
Acetona	0.29	0.44	12.18	1.02	3.09	4.95	58.41	4.84
Excl. molec.								
Fracc. 10	0.004	0.58	0.96	1.35	0.05	7.59	0.17	7.91
Fracc. 13	0.001	0.67	0.04	1.56	0.02	8.69	0.38	9.05

En las vísceras de anchoveta se detectó el doble de actividad quimiotripsina que tripsina (Tabla III). Estos resultados concuerdan con lo reportado para la sierra tropical *Scomberomorus concolor* la cual mostró mayor actividad quimiotripsina que tripsina (Olivas-Burrola *et al.*, 2001).

V.1.3 Purificación de enzimas proteolíticas presentes en subproducto del procesamiento de sardina (vísceras y fluidos corporales)

Mediante cromatografía de exclusión molecular se separaron las proteínas de elevado peso molecular con poca actividad específica tripsina y quimiotripsina de aquellas proteínas con peso molecular pequeño y gran actividad específica. En este paso de purificación se lograron los mejores resultados de actividades tripsina y quimiotripsina (5.68 y 6.62 U/mg de proteína, respectivamente) (Tablas IV y V) e incluso el factor de purificación de tripsina y quimiotripsina fue elevado (12.63 y 7.44, respectivamente) para esta etapa de purificación, ya que se han reportado 1.7 U/mg de proteína de actividad tripsina y un factor de purificación de 1.3 en vísceras de sardina Monterrey (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005) después de preparar el extracto, concentrar con sulfato de amonio y realizar cromatografía de exclusión molecular. Cabe mencionar que las cinco fracciones obtenidas fueron combinadas y concentradas con acetona y después se realizaron los ensayos de proteína y actividades enzimáticas.

Tabla IV. Purificación de enzimas proteolíticas de subproducto del procesamiento de sardina (vísceras y fluidos corporales).

Fracción	Proteína, mg·g sub ⁻¹	Actividad proteolítica, U·g sub ⁻¹	Actividad proteolítica, U·mg prot ⁻¹	Rend. act. proteolítica, %	Factor purific. proteasas	Rend. proteína, %
Extracto crudo	2.11	0.24	0.06	100	1	100
Acetona	0.20	0.07	0.14	29.17	1.27	9.48
Exclusión molecular*	0.02	0.004	0.27	1.67	2.45	0.95
Intercambio iónico*	0.001	0.0003	0.24	0.125	2.18	0.05

*Después de concentrar con acetona.

Tabla V. Caracterización parcial de enzimas proteolíticas de subproducto del procesamiento de sardina (vísceras y fluidos corporales).

Fracción	Tripsina				Quimiotripsina			
	Actividad, U-g sub ⁻¹	Actividad, U-mg prot ⁻¹	Rend. de act., %	Factor de purific.	Actividad, U-g sub ⁻¹	Actividad, U-mg prot ⁻¹	Rend. de act., %	Factor de purific.
Extracto crudo	1.77	0.45	100	1	3.47	0.89	100	1
Acetona	0.11	1.08	6.21	2.4	0.43	4.30	12.39	4.83
Excl. molec.*	0.02	5.68	1.13	12.63	0.02	6.62	0.58	7.44
Interc. Iónico*	N.D.	N.D.	-	-	0.002	1.62	0.06	1.82

N.D. = No se detectó actividad enzimática.

*Después de concentrar con acetona.

Sin embargo, el rendimiento de actividad tripsina y quimiotripsina así como de proteína fueron muy bajos (1.13%, 0.58% y 0.95%, respectivamente). Después de concentrar con acetona, las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular fueron separadas mediante cromatografía de intercambio iónico (Figura 9) la cual produjo 30 fracciones. En las fracciones 3 y 4 se detectó la mayor actividad quimiotripsina y la fracción 28 mostró la mayor actividad tripsina así como actividad proteolítica total durante la elusión basada en un gradiente lineal de NaCl desde 0 hasta 0.3 M en solución amortiguadora. Este patrón de elusión de tripsina concuerda con el reportado por Castillo-Yáñez *et al.* (2005) para vísceras de sardina Monterrey. En este paso no se logró aumentar el factor de purificación de tripsina ni quimiotripsina (Tabla IV), por el contrario, el factor de purificación de quimiotripsina descendió desde 7.44 hasta 1.82, y no se logró recuperar proteína con actividad tripsina, esto puede atribuirse a la mínima cantidad de proteína soluble obtenida en la fracción 28 (la cual mostró mayor actividad tripsina) que fue de 0.004 mg/ml antes de concentrar con acetona lo que no

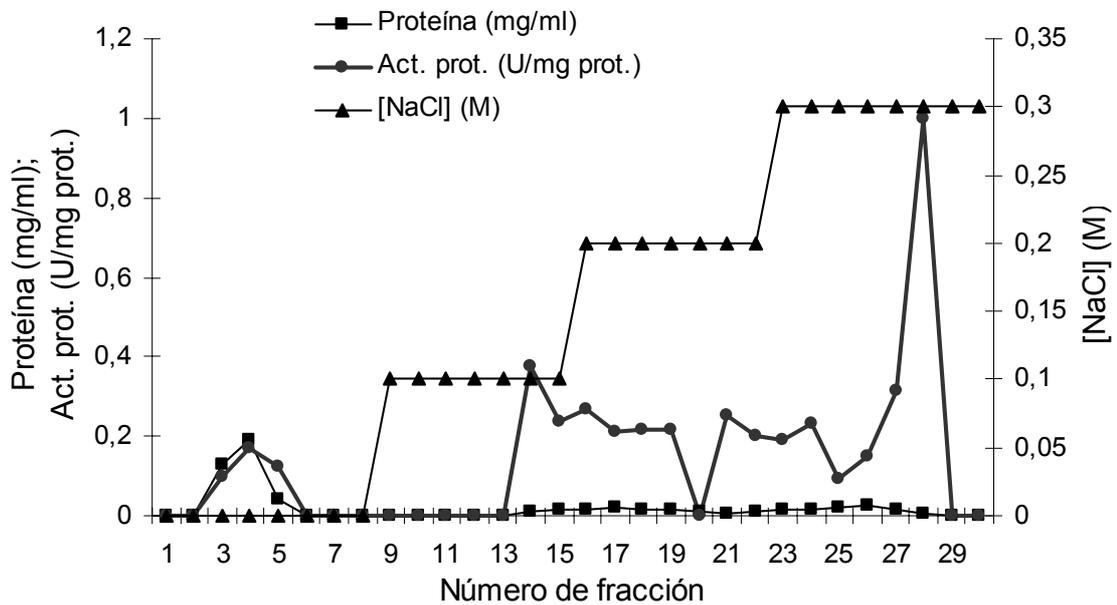


Figura 9. Cromatografía de intercambio iónico. Solución amortiguadora de Tris-HCl 20 mM, pH 7.5. Elución con un gradiente lineal con un incremento en concentración de NaCl desde 0 hasta 0.3 M en solución amortiguadora. Una unidad de actividad proteolítica se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de $1\mu\text{mol}$ de grupos azo a partir de azocaseína por minuto bajo las condiciones de ensayo.

permitió su detección en los ensayos realizados posteriormente, mientras que la concentración de proteína de las fracciones 3 y 4 una vez combinadas fue de 0.323 mg/ml.

Tanto en anchoveta (Tabla III) como en sardina (Tabla V) predominó la actividad quimiotripsina sobre tripsina destacando así la importancia de la enzima quimiotripsina en el proceso digestivo de éstos peces. Tal como se mencionó anteriormente, éste comportamiento ya se ha reportado para otras especies como la sierra tropical (Olivas-Burrola *et al*, 2001).

Debido a los bajos rendimientos obtenidos de la purificación de enzimas proteolíticas procedentes tanto de anchoveta como de sardina, discutidos anteriormente, se optó por preparar dos grupos de extractos de subproducto del procesamiento de sardina: 1) vísceras y fluidos corporales y 2) cabeza, cola y vísceras; concentrar la proteína soluble presente en los extractos utilizando acetona y hacer la caracterización parcial enzimática de los extractos en cada paso de su preparación, esto con base en los resultados, los cuales muestran que concentrando con acetona (sin llevar a cabo ningún tipo de cromatografía) se obtienen los mayores rendimientos tanto de proteína como de actividad proteolítica (Figura 6).

V.2 Análisis proximal de los extractos de vísceras y fluidos corporales

Con la finalidad de conocer la eficiencia de la metodología de preparación de extractos en términos de recuperación de proteína soluble y eliminación de lípidos utilizada en el presente trabajo, se realizó un análisis proximal del subproducto vísceras y fluidos corporales tanto del material sin procesar como de los extractos preparados. El contenido de proteína cruda en la materia prima fue de 36.25% y en el extracto crudo de 35.96%, esto es, una recuperación del 99% de proteína. En contenido de lípidos, se encontró un 29% en la materia prima y 2.80% en el extracto crudo, logrando así una remoción del 90% de lípidos (Tabla VI). Hay un aumento del 10% en el contenido de cenizas en el extracto crudo. Esto se atribuye al volumen de NaOH que fue necesario agregar durante la preparación del extracto crudo para alcanzar un pH de 11.5. Kristinsson y Rasco, (2000) reportan un incremento en la cantidad de cenizas en hidrolizados de salmón del atlántico debido a la adición de CaCl₂, NaOH y HCl durante la preparación del extracto.

Tabla VI. Resultados del análisis proximal realizado a la materia prima (vísceras y fluidos corporales) así como al extracto crudo².

Análisis	Materia prima (vísceras y fluidos corporales), %	Extracto crudo, %	Método
Proteína cruda	36.25	35.96	Kjeldahl
Lípidos	28.97	2.80	Extracto etéreo (NOM-086-SSA1-1994)
Cenizas	11.91	22.74	Gravimétrico

Estos resultados indican una alta eficiencia de la metodología utilizada para la preparación de extractos crudos ya que, por un lado, la pérdida de proteína es mínima (1%) y, por otro, se eliminan el 90% de los lípidos. Esto es sumamente importante ya que Kanner y Rosenthal (1992) reportaron que la oxidación de lípidos es la principal causa del deterioro de la calidad de la proteína, y Matsushita *et al.* (1970) probaron que la oxidación de lípidos inhibe la actividad proteasa. Además, ésta metodología no implica el manejo de sustancias como CCl₄ (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005) que puede causar graves problemas a la salud (ATSDR, 2005).

V.3 Caracterización de enzimas proteolíticas y lipasa presentes en subproducto del procesamiento de sardina (vísceras y fluidos corporales y cabeza, cola y vísceras)

Los resultados obtenidos en ésta sección, se compararon estadísticamente utilizando una prueba “t” con una significancia del 99%. Se encontró que la actividad proteolítica en vísceras y fluidos corporales es significativamente mayor ($p < 0.01$) a

² Análisis realizado por SALIP Laboratorio Industrial y de Control, S. de R. L. de C. V. Carretera Ensenada-Tecate km 103, El Sauzal de Rodríguez, Ensenada, Baja California, 22760. Tel.: 174-67-63; tel./fax: 174-60-35.

la de cabeza, cola y vísceras, destacando la actividad quimiotripsina (67 U·mg proteína⁻¹) (Tablas VIII y X) en el concentrado de vísceras y fluidos corporales. En lo que respecta a tripsina se tiene una actividad de 7.92 U·mg proteína⁻¹, cabe destacar que el factor de purificación logrado en éste paso es mayor al reportado en otros trabajos (Castillo-Yáñez *et al.*, 2005) al purificar tripsina a partir de sardina Monterrey precipitando con sulfato de amonio en lugar de acetona. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) en la actividad proteolítica después de liofilizar el concentrado de vísceras y fluidos corporales (Tabla VII), mientras que en el liofilizado del concentrado de cabeza, cola y vísceras sí se encontraron diferencias significativas (Tabla IX). Aunque hay una pérdida de proteína al liofilizar ambos concentrados, los resultados sugieren que las proteínas que se pierden en el concentrado de vísceras y fluidos corporales no son enzimas proteolíticas, por lo que en éste caso con la liofilización se logra una purificación de éstas enzimas. Esto destaca la alta resistencia de las enzimas proteolíticas. No así las enzimas lipasas, ya que hubo una disminución en la actividad después de la liofilización. Los resultados anteriores indican que entre mayor sea la cantidad de proteína de no interés contenida en un extracto proteico (tal como es el caso del extracto de cabeza, cola y vísceras que contiene proteínas tanto de vísceras como de músculo) aumenta la pérdida de proteínas de interés a través de los pasos de purificación.

Tabla VII. Purificación parcial de proteasas y lipasas del subproducto del procesamiento de sardina (vísceras y fluidos corporales)^a.

Fracción	Proteína mg·g sub ⁻¹	Actividad proteolítica, U·mg prot ⁻¹	Actividad proteolítica, U·g sub ⁻¹	Actividad lipasa, U·mg prot ⁻¹	Actividad lipasa, U·g sub ⁻¹	Rend. act. proteolítica, %	Factor purific. proteasas	Rend. act. lipasa, %	Factor purific. lipasas	Rend. proteína, %
Extracto crudo	6.15±0.49 ^a	2.86±0.35 ^b	13.13±1.40 ^a	0.025±0.001 ^c	1.358±0.18 ^a	100	1	100	1	100
Acetona	0.59± 0.07 ^b	6.77±0.31 ^a	2.95±0.37 ^b	0.441±0.032 ^a	0.459±0.02 ^b	22.47	2.37	33.80	17.64	9.59
Liofilizado	0.01± 0.001 ^c	7.34±0.87 ^a	0.07±0.006 ^c	0.174±0.02 ^b	0.019±0.002 ^c	0.53	2.57	1.40	6.96	0.16

^aLos promedios con diferente superíndice en una misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.01$) (a>b>c)

Tabla VIII. Caracterización parcial de enzimas proteolíticas del subproducto del procesamiento de sardina (vísceras y fluidos corporales)^a.

Enzima	Extracto crudo				Concentrado con acetona			
	Actividad, U·mg prot ⁻¹	Actividad, U·g sub ⁻¹	Rendimiento de act., %	Factor de purificación	Actividad, U·mg prot ⁻¹	Actividad U·g sub ⁻¹	Rendimiento de act., %	Factor de purificación
Tripsina	2.42±0.22 ^b	13.13±1.74 ^a	100	1	7.92±0.93 ^a	2.03±0.17 ^b	15.46	3.27
Quimiotripsina	21.57±1.55 ^b	116.34±3.50 ^a	100	1	67.00±4.52 ^a	17.26±1.51 ^b	14.84	3.11
Aminopeptidasa	0.12±0.01 ^b	3.17±0.37 ^a	100	1	5.77±0.59 ^a	2.96±0.20 ^a	93.37	48.08
Pepsina	0.09±0.006 ^b	0.76±0.10 ^a	100	1	0.18±0.009 ^a	0.15±0.01 ^b	19.74	2.09
Carboxipeptidasa A	0.46±0.04	1.02±0.12	100	1	N.D.	N.D.	-	-
Carboxipeptidasa B	N.D.	N.D.	-	-	N.D.	N.D.	-	-

^aLos promedios con diferente superíndice en un mismo renglón son significativamente diferentes ($p < 0.01$) (a>b). Una comparación se realizó entre U·mg prot⁻¹ en el extracto crudo y el concentrado con acetona; y otra entre U·g sub⁻¹ en el extracto crudo y el concentrado con acetona. N.D. = No se detectó actividad enzimática

Tabla IX. Purificación parcial de proteasas y lipasas del subproducto del procesamiento de sardina (cabeza, cola y vísceras)^a.

Fracción	Proteína, mg·g sub ⁻¹	Actividad proteolítica, U·mg prot ⁻¹	Actividad proteolítica, U·g sub ⁻¹	Actividad lipasa, U·mg prot ⁻¹	Actividad lipasa, U·g sub ⁻¹	Rend. act. proteolítica %	Factor purific. proteasas	Rend. act. lipasa, %	Factor purific. lipasas	Rend. proteína, %
Extracto crudo	15.52±0.96 ^a	0.15±0.017 ^c	1.66±0.28 ^a	0.01±0.0005 ^c	1.016±0.1 ^a	100	1	100	1	100
Acetona	1.14±0.09 ^b	0.68±0.06 ^a	0.54±0.07 ^b	0.17±0.006 ^a	0.224±0.006 ^b	32.53	4.53	22.05	15.45	7.34
Liofilizado	0.04±0.004 ^c	0.30±0.026 ^b	0.02±0.002 ^c	0.03±0.0027 ^b	0.015±0.0008 ^c	1.20	2	1.47	2.82	0.26

^aLos promedios con diferente superíndice en una misma columna son significativamente diferentes ($p < 0.01$) (a>b>c)

Tabla X. Caracterización parcial de enzimas proteolíticas del subproducto del procesamiento de sardina (cabeza, cola y vísceras)^a.

Enzima	Extracto crudo				Concentrado con acetona			
	Actividad, U·mg prot ⁻¹	Actividad, U·g sub ⁻¹	Rendimiento de act., %	Factor de purificación	Actividad, U·mg prot ⁻¹	Actividad, U·g sub ⁻¹	Rendimiento de act., %	Factor de purificación
Tripsina	0.77±0.06 ^a	9.89±0.96 ^a	100	1	0.36±0.02 ^b	0.33±0.03 ^b	3.34	0.46
Quimiotripsina	0.81±0.03 ^b	10.48±0.25 ^a	100	1	1.77±0.04 ^a	1.64±0.22 ^b	15.65	2.19
Aminopeptidasa	0.005±0.0005	0.63±0.05	100	1	N.D.	N.D.	-	-
Pepsina	0.02±0.0013 ^b	0.4±0.037 ^a	100	1	0.05±0.002 ^a	0.08±0.01 ^b	20	2.8
Carboxipeptidasa A	N.D.	N.D.	-	-	N.D.	N.D.	-	-
Carboxipeptidasa B	N.D.	N.D.	-	-	N.D.	N.D.	-	-

^aLos promedios con diferente superíndice en un mismo renglón son significativamente diferentes ($p < 0.01$) (a>b). Una comparación se realizó entre U·mg prot⁻¹ en el extracto crudo y el concentrado con acetona; y otra entre U·g sub⁻¹ en el extracto crudo y el concentrado con acetona. N.D. = No se detectó actividad enzimática.

Tabla XI. Resultados de actividades enzimáticas en concentrados de vísceras y fluidos corporales y de cabeza, cola y vísceras de sardina^a.

Enzima(s)	Actividad, U·mg proteína ⁻¹	
	Conc. de vísceras y fluidos corporales	Conc. de cabeza, cola y vísceras
Proteolíticas	6.77±0.31 ^a	0.68±0.06 ^b
Tripsina	7.92±0.93 ^a	0.36±0.02 ^b
Quimiotripsina	67.00±4.52 ^a	1.77±0.04 ^b
Aminopeptidasa	5.77±0.59	N.D.
Pepsina	0.178±0.009 ^a	0.053±0.002 ^b
Carboxipeptidasa A	N.D.	N.D.
Carboxipeptidasa B	N.D.	N.D.
Lipasas	0.441±0.032 ^a	0.170±0.006 ^b

N.D. = No se detectó actividad enzimática.

^aLos promedios con diferente superíndice en un mismo renglón son significativamente diferentes ($p < 0.01$) ($a > b$).

La actividad aminopeptidasa se conservó después de concentrar con acetona el extracto de vísceras y fluidos corporales y se logró un factor de purificación de 48, un rendimiento de actividad del 93% y 5.77 U·mg proteína⁻¹, los cuales son resultados muy notables. Sin embargo, al concentrar con acetona el extracto crudo de cabeza, cola y vísceras, se perdió la actividad aminopeptidasa (Tabla VIII). Se detectó actividad carboxipeptidasa A en el extracto crudo de vísceras y fluidos corporales, sin embargo se perdió después de concentrar con acetona. No se detectó actividad carboxipeptidasa A desde el extracto crudo de cabeza, cola y vísceras (Tabla X).

Los resultados de la determinación cualitativa de la actividad colagenasa fueron los siguientes: después de 180 min de reacción de la muestra con el sustrato, se formó una cavidad únicamente en el lugar en el que se depositó la muestra. La cavidad tuvo diferente profundidad, siendo mucho mayor en el concentrado de vísceras y fluidos corporales. No se observó formación de cavidad en el blanco. Existen dos tipos de colagenasas: las serina colagenasas y las metalo-colagenasas. Las

proteasas serina colagenasas han sido aisladas del hepatopáncreas del cangrejo violinista *Uca pugilator* (Eisen *et al.*, 1973) y de los órganos internos (vísceras) de la macarela *Scomber japonicus* (Park *et al.*, 2002), lo cual indica que la actividad detectada cualitativamente se trata de una serina colagenasa ya que ésta enzima interviene en la digestión del alimento, en este caso la grenetina, a diferencia de las metalo-colagenasas, las cuales requieren Ca^2 para su estabilidad (en el ensayo aquí realizado no se agregó Ca^2) y tienen como función la remodelación de la matriz extracelular, esto es, una función en la morfogénesis celular (Park *et al.*, 2002).

El haber encontrado significativamente mayor actividad enzimática alcalina (tripsina, quimiotripsina, aminopeptidasa, carboxipeptidasa A y colagenasa) que actividad enzimática ácida (pepsina) concuerda con información reportada por Castillo-Yáñez *et al.* (2004) en donde los resultados sobre actividad proteolítica en vísceras de sardina Monterrey mostraron que la actividad alcalina es mayor que la actividad ácida.

Es importante comentar los coeficientes de variación obtenidos en los resultados. Partiendo del criterio de que hay una buena reproducibilidad en los resultados cuando el coeficiente de variación es menor que 10%, y baja si éste es mayor que 15%, se tiene entonces que algunos de los resultados de actividad proteolítica (tripsina, aminopeptidasa, pepsina y carboxipeptidasa A) en extracto crudo de vísceras y fluidos corporales (principalmente) tienen un coeficiente de variación mayor que 10% y menor que 15%, se hablaría entonces de una relativa buena reproducibilidad. Esto tiene relación directa con lo reportado por Horn (1998), quien encontró que la actividad proteasa en los peces es sumamente influenciada por el contenido de proteína presente en los alimentos ingeridos, proponiendo la siguiente

correlación: a mayor nivel de proteína contenido en el alimento, mayor nivel de secreción de enzimas proteolíticas y mayor actividad. Esto sugiere que la actividad enzimática endógena puede variar según la calidad de las vísceras (Aspmo *et al.*, 2005).

V.4 Producción de hidrolizados de subproducto del procesamiento de sardina

V.4.1 Proceso catalítico de hidrólisis enzimática

Debido a la hidrólisis proteica, las propiedades moleculares de los productos cambian, tales como el decremento en el peso molecular, incremento en la carga y exposición de grupos hidrofóbicos. Estos cambios moleculares afectan las propiedades funcionales de los hidrolizados, las cuales pueden ser detectadas mediante diferentes métodos analíticos tales como grado de hidrólisis y distribución de pesos moleculares (Van der Ven, 2002). En la Tabla XII se muestran los resultados del grado de hidrólisis (GH) logrado utilizando tres preparaciones enzimáticas en combinación con las enzimas endógenas contenidas en el sustrato. Se logró un GH significativamente mayor usando el concentrado de vísceras y fluidos corporales (85%) siendo éste un 25% mayor al GH alcanzado con el concentrado de cabeza, cola y vísceras (62%), mientras que con alcalasa se obtuvo el menor GH (28%).

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Kristinsson y Rasco (2002) quienes lograron un GH del 5% usando alcalasa en una hidrólisis enzimática de salmón del Atlántico por un tiempo de 180 min, E/S = 7.5% y 40 °C con la cual obtuvieron la menor eficiencia en términos de GH, mientras que la mayor eficiencia la

lograron usando Corolasa 7089 (GH = 15%) y un extracto de enzimas endógenas (GH = 15%).

Tabla XII. Grado de hidrólisis del subproducto del procesamiento de sardina logrado usando alcalasa y extractos concentrados de enzimas endógenas en combinación con las enzimas endógenas contenidas en el sustrato en una relación E/S = 25% en un tiempo de reacción de 312 min a 30 °C^a.

Preparación enzimática	GH, %
Alcalasa	28±0.37 ^c
Concentrado de vísceras y fluidos corporales	85±1.02 ^a
Concentrado de cabeza, cola y vísceras	62±3.96 ^b

^aPromedios con diferente superíndice son significativamente diferentes ($p<0.01$) ($a>b>c$).

El haber logrado grados de hidrólisis significativamente mayores al utilizar el concentrado de vísceras y fluidos corporales que con el concentrado de cabeza, cola y vísceras puede atribuirse a los siguientes factores: 1) la actividad proteolítica total en el concentrado de vísceras y fluidos corporales es significativamente mayor a la de cabeza, cola y vísceras, y 2) el concentrado de vísceras y fluidos corporales posee actividad aminopeptidasa, mientras que en el concentrado de cabeza, cola y vísceras no se encontró tal actividad enzimática (Tablas VIII, X y XI).

La utilización de enzimas exógenas (aquellas agregadas al sustrato) en combinación con las enzimas endógenas (aquellas contenidas en el sustrato) ya se ha sido reportado por Aspino *et al.* (2005) quienes utilizaron enzimas endógenas contenidas en el sustrato en combinación con enzimas comerciales.

V.4.2 Distribución de pesos moleculares de productos de la hidrólisis

La distribución de tamaño de los péptidos de un hidrolizado puede ser útil para predecir la capacidad antigénica del mismo, así como para mostrar diferencias en la actuación de distintos pretratamientos del sustrato o enzimas utilizadas (Guadix *et al.*, 2000).

Para éste fin, el método que mejores resultados ha dado (por su resolución y cuantificación más precisa) ha sido la cromatografía de exclusión molecular-HPLC (Guadix *et al.*, 2000). Se obtuvo una distribución de pesos moleculares de los hidrolizados significativamente diferente ($p < 0.01$) al utilizar las tres preparaciones enzimáticas (Figura 10). Habiendo una mayor concentración de producto en el rango de 10,000 – 13,000 Da en los hidrolizados obtenidos con concentrado de vísceras y fluidos corporales (c); mientras que en los hidrolizados producidos con cabeza, cola y vísceras (d) hubo una mayor concentración de producto en el rango de 5,000 – 5,500 Da. La concentración de producto de ambos hidrolizados es significativamente mayor ($p < 0.01$) que la concentración de producto al utilizar alcalasa.

Los resultados sugieren que la distribución de tamaño de los hidrolizados es una función de la enzima utilizada y del grado de hidrólisis alcanzado. Lo cual concuerda con lo reportado por Guadix *et al.* (2000) y por Kristinsson y Rasco (2000), quienes reportan haber obtenido un perfil de péptidos diferente a distintos grados de hidrólisis, indicando que la distribución de tamaño de los péptidos depende de la enzima, esto debido a las diferencias en la especificidad de sustrato.

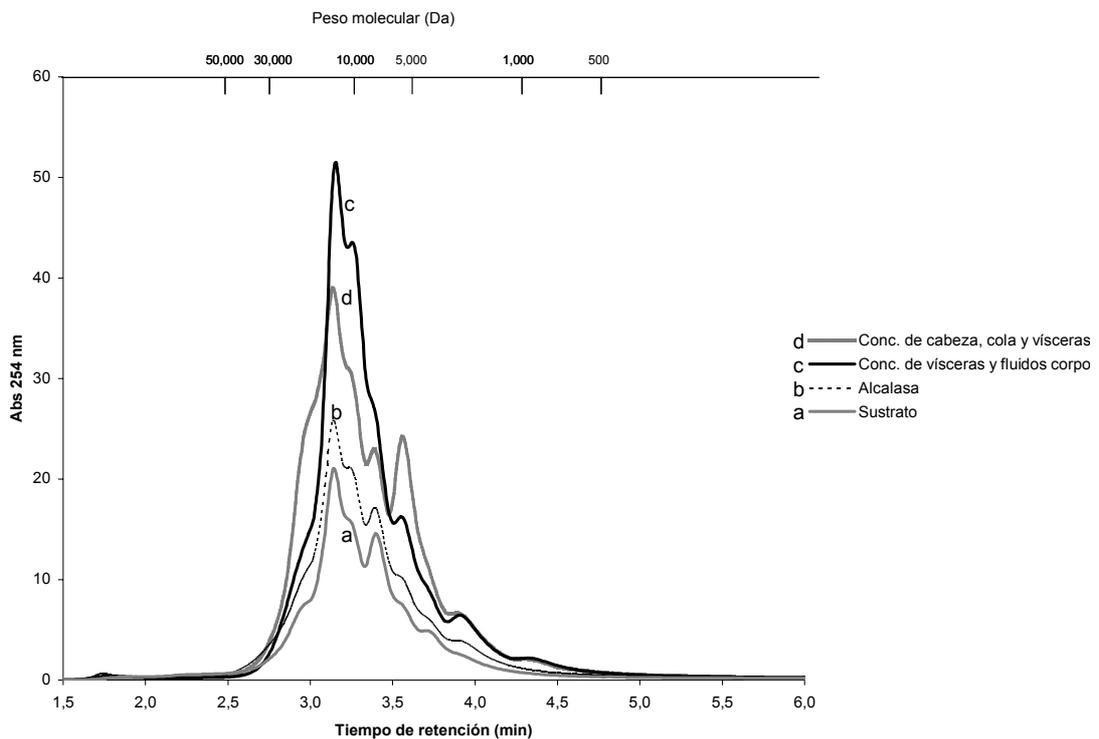


Figura 10. Cromatografía de exclusión molecular-HPLC de los sobrenadantes obtenidos después de 312 min de hidrólisis. Las gráficas muestran la señal del monitoreo a 254 nm. Se muestran los hidrolizados de las reacciones con alcalasa, concentrado de vísceras y fluidos corporales y concentrado de cabeza, cola y vísceras (gráficas b – d, respectivamente) y el sustrato (a). Se inyectó una muestra diluida 1:100, el volumen inyectado fue el mismo. n = 3. En la parte superior de la figura se muestra un eje de masa molecular derivado de experimentos con compuestos estándar. Nótese que éste eje proporciona una aproximación del tamaño del compuesto.

Por otro lado, se parte de un sustrato (extracto crudo de cabeza, cola y vísceras) que al igual que los productos obtenidos con las distintas preparaciones enzimáticas ya tiene una distribución de pesos moleculares relativamente pequeños (Figura 10, inciso a) entre los 2,500 y los 18,500 Da aprox, esto pudiera atribuirse al tratamiento previo que se realizó al sustrato con la finalidad de concentrar la mayor cantidad de proteína, el cual sufrió una hidrólisis básica al incrementar el pH hasta 11.5.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se desarrolló un procedimiento para la purificación y caracterización de enzimas proteolíticas y lipasas a partir de subproductos de pelágicos menores. Así como la utilización de las enzimas proteolíticas purificadas para la obtención de hidrolizados de subproducto del procesamiento de pescado. A partir de los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

1. El procedimiento de preparación del extracto de vísceras y fluidos corporales utilizado permite una recuperación del 99% de proteína y la eliminación del 90.33% de lípidos.
2. De las técnicas de precipitación analizadas, bajo las condiciones experimentales especificadas, la técnica de precipitación con acetona permite concentrar la mayor cantidad de proteína con actividad proteolítica.
3. El procedimiento de purificación de enzimas proteolíticas que consiste en concentrar las proteínas utilizando acetona (sin realizar ningún tipo de cromatografía), permite obtener los mayores rendimientos de actividad proteolítica y de proteína.
4. Las actividades enzimáticas proteasa y lipasa, son significativamente mayores en los extractos de vísceras y fluidos corporales, que en los de cabeza, cola y vísceras.
5. De las actividades enzimáticas evaluadas, la mayor corresponde a quimiotripsina.

6. Los GH's alcanzados utilizando el concentrado de vísceras y fluidos corporales, y el concentrado de cabeza, cola y vísceras; son significativamente mayores a los alcanzados con la enzima comercial alcalasa.
7. Se obtiene una diferencia significativa en el perfil de los pesos moleculares de los péptidos obtenidos utilizando las diferentes preparaciones enzimáticas.

VI.1 Uso potencial

La elevada actividad proteolítica total de los concentrados de vísceras y fluidos corporales a baja temperatura (30 °C) y pH neutro (7.5), además, la conservación de la actividad proteolítica aún después de liofilizar, sugieren un uso potencial de las enzimas proteolíticas purificadas parcialmente, en general, en aquellos procesos en los que se requiera la hidrólisis de proteínas a bajas temperaturas y pH neutro, por ejemplo, la industria alimenticia. Otra aplicación puede ser en el tratamiento de aguas residuales con carga orgánica para reducir su viscosidad. Los hidrolizados proteicos de pescado pueden tener aplicaciones como fuente de nitrógeno en la formulación de alimentos e ingredientes en medios de cultivo microbianos.

RECOMENDACIONES

VII. RECOMENDACIONES

Durante la realización del presente trabajo se observó que después de precipitar proteína utilizando acetona al momento de redissolver el material precipitado puede haber proteína que no se redissuelva, muy probablemente se trata de proteína desnaturalizada. Por lo que se recomienda centrifugar la solución proteica redissuelta con la finalidad de eliminar cualquier material insoluble que pudiera ocasionar posteriormente algún problema.

Se recomienda llevar a cabo un análisis de la composición proximal de los hidrolizados, lo cual permitirá conocer el contenido de proteína, lípidos, cenizas, entre otros datos, de los hidrolizados.

Determinar el contenido de aminoácidos, lo que proporcionará información con respecto a la calidad nutricional de los péptidos obtenidos.

La determinación de la secuencia de los aminoácidos de los péptidos obtenidos permitirá conocer de forma más completa las características funcionales de los hidrolizados.

Evaluar la alergenicidad de los hidrolizados obtenidos, ya que éste es un problema que algunas veces se presenta al consumir productos proteicos.

Todos estos análisis proporcionarán un conocimiento más completo de las características moleculares y funcionales de los hidrolizados y permitirán evaluar su uso ya sea en la industria alimenticia, farmacéutica o en la medicina.

LITERATURA CITADA

LITERATURA CITADA

- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* 27(6): 1256-1262 p.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2005. Carbon tetrachloride. <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts30.html>. Julio, 2006.
- Agrawal VP., K. V. Sastry, S. K. Kaushab. 1975. Digestive enzymes of three teleost fishes. *Acta Physiol Acad Sci Hung.* 46(2): 93-98 p.
- Alarcón-López F. 1997. Procesos digestivos en peces marinos: caracterización y aplicaciones prácticas. Universidad de Almería. Departamento de Biología Aplicada. Almería. 321 p.
- 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 p.
- Burkert J., F. Maugeri, M. Rodrigues. 2004. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. Using factorial design. *Biosource Technology.* 91: 77-84 p.
- Castillo-Yañez F., R. Pacheco-Aguilar, F. García-Carreño, M. Navarrete-Del Toro. 2004. Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chemistry.* 85: 343-350 p.
- Castillo-Yañez F., R. Pacheco-Aguilar, F. García-Carreño, M. Navarrete-Del Toro. 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B* 140: 91-98 p.
- Donovan G., M. Horn, A. Gawlicka. 2004. Digestive enzyme activities in herbivorous and carnivorous prickleback fishes (teleostei: stichaeidae): ontogenic, dietary, and phylogenetic effects. *Physiological and Biochemical Zoology.* 77(5): 789-804 p.
- Eisen A., K. Henderson, J. Jeffrey y R. Bradshaw. 1973. A collagenolytic protease from the hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. Purification and properties. *Biochemistry.* 12: 1814-1822 p.

- Estrada Corona M. 2002. Funcionalidad de hidrolizados enzimáticos de subproductos de carpa dorada (*Carassius auratus*). Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. México. 99 pp.
- García-Franco W., A. Cota-Villavicencio y F. J. Sánchez-Ruíz. 2001. Diagnóstico de la pesquería de peces pelágicos menores en la costa occidental de Baja California, México. INP. SAGARPA. México. Ciencia Pesquera. 14: 113-120 p.
- Gilmartin L. y L. Jervis. 2002. Production of cod (*Gadus morhua*) muscle hydrolysates. Influence of combinations of commercial enzyme preparations on hydrolysate peptide size range. J. Agric. Food Chem. 50: 5417-5423 p.
- González Agráz L. 2000. Estudio comparativo del perfil de algunas enzimas digestivas importantes en *Penaeus stylirostris*, *Penaeus californiensis*, *Procambarus clarkii* y *Cherax quetricarinatus*. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 61 pp.
- 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(1): 79-89 p.
- Horn M. 1998. Feeding and digestion. En: D. Evans (ed.). The physiology of fishes. CRC Press LLC Marine Sciences, New York, 43-60 p.
- Kanner J., I. Rosenthal. 1992. An assessment of lipid oxidation in foods. Pure & Appl. Chem. 64(12): 1959-1964 p.
- Kristinsson H. G. y B. A. Rasco. 2000. Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. J. Agric. Food Chem. 48: 657-666 p.
- Maehashi K., M. Matsuzaki, Y. Yamamoto y S. Udaka. 1999. Isolation of peptides from an enzymatic hydrolysate of food proteins and characterization of their taste properties. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63(3): 555-559 p.
- Mathews C. y K. van Holde. 1998. Bioquímica. McGraw-Hill Interamericana de España, S. A. U. Segunda Edición. Madrid. 1283 pp.
- Matsushita S., M. Kobayashi e Y. Nitta. 1970. Inactivation of enzymes by linoleic acid hydroperoxides and linoleic acid. Agric Biol Chem. 34(6): 817-824 p.

- Michail M., M. Vasiliadou, A. Zotos. 2006. Partial purification and comparison of precipitation techniques of proteolytic enzymes from trout (*Salmo gairdnerii*) heads. Food chemistry 97(1): 50-55 p.
- Murakami K. y M. Noda. 1981a. Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. I. Purification and characterization of three alkaline proteinases from the pyloric caeca. Biochim Biophys Acta. 658(1): 17-26 p.
- Nayak J., N. Wiswanathan, K. Ammu, S. Mathew. 2003. Lipase activity in different tissues of four species of fish: rohu (*Labeo rohita* Hamilton), oil sardine (*Sardinella longiceps* Linnaeus), mullet (*Liza subviridis* Valenciennes) and Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta* Cuvier). Journal of the Science of food and Agriculture. 83(11): 1139-1142 p.
- Noda M. y K. Murakami. 1981b. Studies on proteinases from the digestive organs of sardine. II. Purification and characterization of two acid proteinases from the stomach. Biochim Biophys Acta. 658(1): 27-34 p.
- Olivas-Burrola H., J. Ezquerro-Brauer, O. Rouzaud-Sánchez y R. Pacheco-Aguilar. Protease activity and partial characterization of the trypsin-like enzyme in the digestive tract of the tropical sierra *Scomberomorus concolor*. Journal of Aquatic Food Product Technology. 10(4): 51-64 p.
- Park P., S. Lee, H. Byun, S. Kim y S. Kim. 2002. Purification and characterization of a collagenase from the mackerel, *Scomber japonicus*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 35(6): 576-582 p.
- Prim N., M. Sánchez, C. Ruíz, F. Pastor y P. Díaz. 2003. Use of methylumbeliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 22. 339-346 p.
- Rivera-Santos M. 2003. Purification and characterization of trypsin from intestinal and pyloric caecal tissues of the silk snapper, *Lutjanus vivanus* (Cuvier, 1828). University of Puerto Rico, Mayaguez Campus. Mayagüez. Puerto Rico. 40 pp.
- Rodríguez-Serrano G. 1999. Generalidades. En: L. Prado Barragán, S. Huerta Ochoa, G. Rodríguez-Serrano, G. Saucedo Castañeda (eds). Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México, 15-22 p.

- Rosenberg I. M. 1996. Protein analysis and purification, Benchtop techniques. Birkhäuser. First edition. Boston. 434 pp.
- Ruíz-Durá M. F. 1985. Recursos pesqueros de las costas de México. Limusa S. A. de C. V. Segunda edición. México. 208 pp.
- Rustad T. 2003. Utilization of marine by-products. Electron. J. Environ. Agric. Food Chem. 2(4): 1-6 p.
- SIAP (Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera), con datos de la CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca). 2003. Volumen y participación de la producción pesquera en peso vivo de las principales especies de Baja California. http://www.siap.sagarpa.gob.mx/ar_compesq.html. Julio, 2006.
- Sharma R., Y. Chisti y U. Chand. 2001. Production, purification characterization and applications of lipases. Biotechnology advances. 19. 627-662 p.
- 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.
- Yang J., Y. Koga, H. Nakano y T. Yamane. 2002. Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through *in vitro* combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site. Protein Engineering. 15(2): 147-152 p.

APÉNDICES

APÉNDICE I. CURVA ESTÁNDAR DE L-LEUCINA

Con la finalidad de determinar la concentración de los grupos α -amino contenidos en los hidrolizados producidos, se construyó una curva estándar de L-leucina utilizando el método de TNBS con base en lo reportado por Adler-Nissen (1979) y Estrada-Corona (2002), para lo cual se hicieron diluciones de una solución de L-leucina 6 mM de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla XIII. Diluciones para la construcción de una curva estándar de L-leucina.

No. frasco	Solución L-leucina, μ l	Agua desionizada, μ l	Concentración L-leucina, mM
Blanco	0	100	0
1	10	90	0.6
2	20	80	1.2
3	30	70	1.8
4	40	60	2.4
5	50	50	3.0
6	60	40	3.6
7	70	30	4.2
8	80	20	4.8
9	90	10	5.4
10	100	0	6.0

Una vez realizadas las diluciones se tomaron alícuotas de 0.064 ml de cada dilución y se depositaron en frascos ámbar de 7 ml, enseguida se adicionaron 1 ml de solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.2 M, pH 8.2 y 0.5 ml de TNBS al 0.05% (fresco). Las reacciones se llevaron a cabo en un baño de agua a 50 °C durante 60 min (protegiendo de la luz cubriendo el baño de agua con papel aluminio). Transcurrido éste tiempo se detuvieron las reacciones al agregar 1 ml de HCl 0.1 N. Las mezclas de reacción se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente durante 15

min envueltas en una bolsa negra (para aislar de la luz). Posteriormente se leyó la absorbancia a 420 nm. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado. A continuación se presenta la curva estándar obtenida:

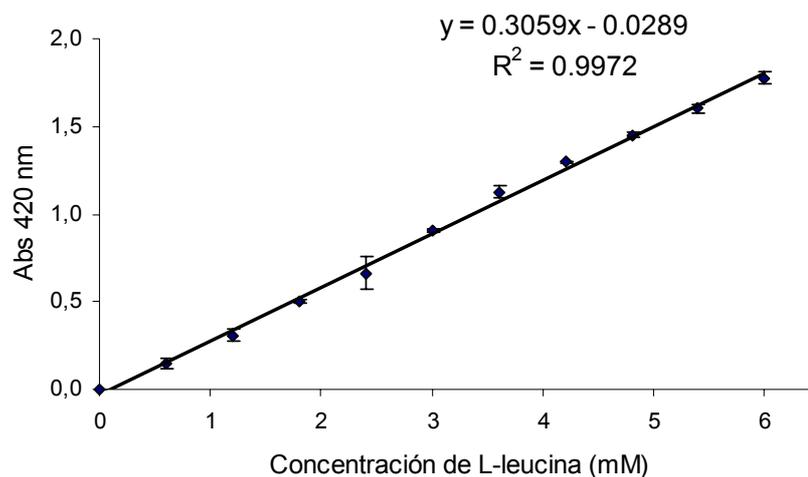


Figura 11. Curva estándar para la cuantificación de grupos α -amino de acuerdo al método de TNBS usando como referencia una solución de L-leucina 6 mM.

APÉNDICE II. CURVA ESTÁNDAR DE PESOS MOLECULARES DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS

Mediante cromatografía de exclusión molecular-HPLC se obtuvo una curva estándar de pesos moleculares de proteínas y péptidos usando una columna ZORBAX Bio Series GF-250 (Agilent). 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. Los estándares utilizados fueron: albúmina de suero bovino (66,430 Da), cloroperoxidasa (42,000 Da), tripsina tipo IX (23,800 Da), ribonucleasa A (13,700 Da) y Ala-*p*-nitroanilida (245.7 Da). Esto produjo una correlación casi lineal entre el tiempo de retención y el ln del peso molecular de los péptidos, en la Tabla XIV se muestran los detalles para la construcción de la curva estándar.

Tabla XIV. Proteínas y péptidos utilizados para la construcción de una curva estándar para determinación de peso molecular de proteínas y péptidos.

Proteína	Peso molecular, Da	Tiempo de retención, min	ln peso molecular
BSA	66,430	2.351	11.10
Cloroperoxidasa	42,000	2.494	10.65
Tripsina	23,800	3.058	10.08
Ribonucleasa A	13,700	3.112	9.53
Ala- <i>p</i> -nitroanilida	245.7	5.013	5.50

En la Figura 12 se presenta la curva estándar obtenida para la determinación de pesos molecular de proteínas y péptidos.

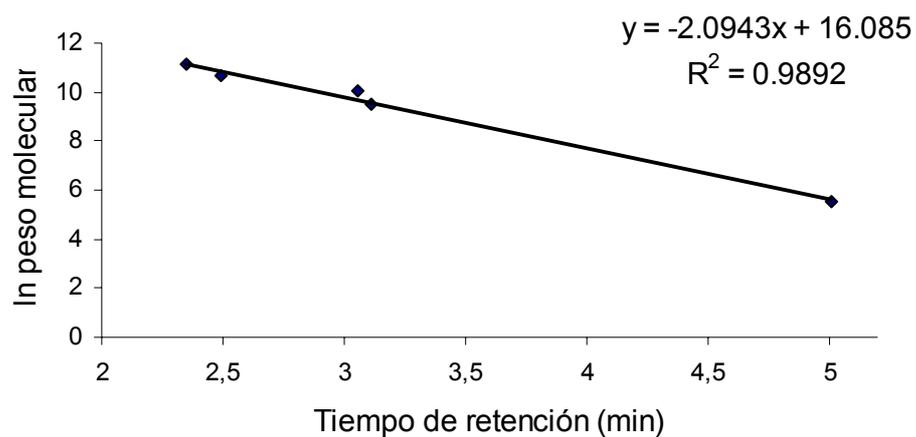


Figura 12. Curva estándar de proteínas y péptidos obtenida mediante cromatografía de exclusión molecular-HPLC usando una columna ZORBAX Bio Series GF-250. La fase móvil consistió en solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.018 M, pH 7.0 NaCl 0.11 M. La velocidad de flujo fue 1 ml/min. La absorbancia se monitoreó a 210, 220, 230, 254 y 410 nm.

APÉNDICE III. CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNA SOLUBLE

Para cuantificar el contenido de proteína soluble se realizó una curva estándar de proteína utilizando como referencia albúmina de suero bovino (BSA) de acuerdo al método propuesto por Bradford (Rosenberg, 1996). Para tal propósito se preparó una solución de BSA a una concentración de 0.2 mg/ml, enseguida se hicieron diluciones de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla XV. Diluciones para la construcción de una curva estándar de proteína soluble.

No. tubo	Solución BSA (0.2 mg/ml), μ l	Agua destilada, μ l	Colorante Bradford (Bio-Rad), μ l	Concentración de proteína, μ g/ml
Blanco	0	800	200	0
1	12.5	787.5	200	2.5
2	25	775	200	5
3	37.5	762.5	200	7.5
4	50	750	200	10

En la siguiente figura se presenta la curva estándar preparada:

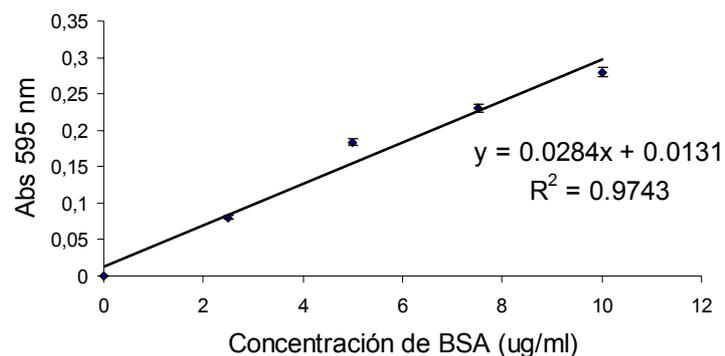


Figura 13. Curva estándar para la cuantificación de proteína soluble de acuerdo al método de Bradford usando como referencia una solución de BSA (0.2 mg/ml).

APÉNDICE IV. GLOSARIO

Alergia: respuesta inflamatoria producida por el cuerpo ante la invasión de agentes extraños (por ejemplo, el polen) que por si solos no son dañinos.

Antígeno: sustancia que puede desencadenar una respuesta inmunitaria específica.

Catalizador: sustancia que acelera la velocidad de una reacción química, sin que sufra cambios permanentes durante el proceso. Los catalizadores biológicos son las enzimas.

Cromatografía de exclusión molecular: técnica para separar mezclas de proteínas que difieren en tamaño. La mezcla se coloca cuidadosamente en la parte superior de un cilindro de vidrio empacado con esferas porosas. Las proteínas más pequeñas viajan más lentamente que las proteínas más grandes a través de la columna. Por lo que las diferentes proteínas tienen distintos volúmenes de elusión y pueden ser colectados en diferentes fracciones líquidas.

Cromatografía de intercambio iónico: técnica para separa proteínas que difieren en su carga neta, mediante columnas empacadas con esferas especiales que poseen, ya sea carga negativa o positiva. Las proteínas que tienen la misma carga neta que las esferas son repelidas y fluyen a través de la columna, mientras que las proteínas que tienen carga opuesta se unen a las esferas. Las proteínas unidas fluyen pasando un gradiente de sal (generalmente de NaCl o KCl) a través de la columna. Conforme los iones se unen a las esferas, estos separan a las proteínas.

Electroforesis: técnica de separación de proteínas con base en sus masas. Las proteínas se separan en bandas de acuerdo a su tamaño conforme migran a través de un gel. Las bandas de proteínas separadas son visualizadas mediante tinción con un colorante.

Enzima: proteína u otra molécula que actúa como catalizador de las reacciones biológicas.

Hidrolizado: es el producto de la disociación de la estructura primaria de las proteínas provocada por enzimas proteolíticas o sustancias químicas, mediante una reacción en la que se rompe un enlace covalente debido a la adición de hidrógeno al átomo que forma un lado del enlace original, y un grupo hidroxilo al átomo del otro lado.

pH: una medida de la acidez de una solución; el logaritmo negativo de la concentración de ión hidrógeno.

pl: es el pH al que la carga media para todas las formas de la molécula es cero.