

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.

ELABORACION DE HIDROLIZADOS PROTEICOS FUNCIONALES PARA
CONSUMO HUMANO A PARTIR DE ESPECIES MARINAS SUBUTILIZADAS

POR

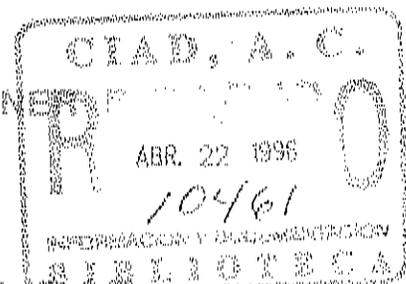
MIGUEL ANGEL MAZORRA MANZANO

TESIS APROBADA POR LA

DIRECCION DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS ESPECIALIDAD
EN NUTRICION Y ALIMENTOS

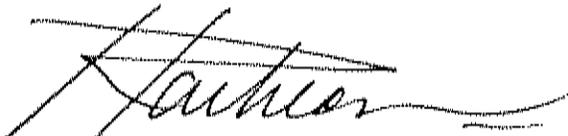


HERMOSILLO, SONORA.

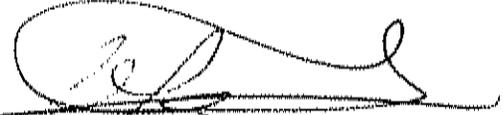
DICIEMBRE DE 1995

APROBACIÓN

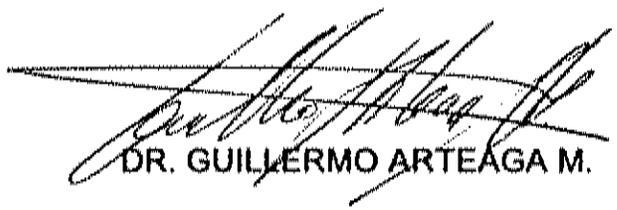
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Miguel Ángel Mazorra Manzano, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Nutrición y Alimentos, dentro del programa de Maestría en Ciencias de la Dirección de Ciencia y Tecnología de Alimentos.



DR. RAMON PACHECO AGUILAR



DR. MAURO E. VALENCIA JUILLERAT



DR. GUILLERMO ARTEAGA M.

DECLARACIÓN DEL AUTOR

Se permiten citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para citas y consultas mas amplias o para la reproducción Integra de este documento con fines académicos, se podrá solicitar permiso al Director del Centro o al Jefe del Departamento de Alimentos de Origen Animal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apartado Postal 1735. Hermosillo, Sonora. México. C.P. 83000. Bajo cualquier otra circunstancia, deberá solicitar permiso al autor.

Firma


Miguel Ángel Mazofra Manzano

DEDICATORIA

A mis padres Lina y Marcos, con todo respeto y cariño por la confianza y apoyo brindado para lograr una de los objetivos de mi vida.

A mis hermanos: Cecilio, Victor, Oscar, Marco Antonio, Jorge, Isaac, Rigoberto, Martín Ismael, Rosa Maria, Dora Gabriela y Josefina, por formar parte de esta gran familia y por ser como son.

A mis cuñadas, cuñados y sobrinos con todo cariño.

A mi amigo de siempre Juan Carlos Ramírez, por su amistad y apoyo.

Al Dr. Ramon Pacheco por ser un gran asesor y amigo a todo dar.

A todos mis compañeros, gracias por compartir conmigo parte de su vida.

Miguel Angel

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por su apoyo para efectuar mis estudios de Posgrado.

Mi mayor agradecimiento al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), por permitirme formar parte de él, durante mis estudios de Maestría.

Al Dr. Ramón Pacheco Aguilar, por haberme confiado el proyecto de mayor importancia para el desarrollo de este trabajo, por su amistad y por ser un asesor de gran calidad y espíritu científico.

Al Dr. Mauro E. Valencia J. y al Dr. Guillermo E. Arteaga M. por su valiosa ayuda y sugerencias aportadas al desarrollo de mi trabajo de tesis, por su amistad.

A la Dra. Belinda Vallejo Cordoba por aceptar formar parte del jurado y su amistad.

A mis amigos con todo cariño: Claudia Naves, Pame Granados, Tere, Huber, Gabriel, Julian, Amparo, Chabelo, Guille, y Juan Carlos Ramírez.

Al DTAOA especialmente a mis compañeros que forman parte en la historia de marinos: Cuquis, Tere Medrano, Panchito, Ana Maria, Diana, Laura Castro, Rosa Elena, Silvia, Karla, Laura Terán, Chabelo, Mimi, Betty, Jose, Muy, Victor y con aprecio especial a Tere Domínguez y Verónica (TVitas), Roxana, Guille, Maria Elena, Fali y Juan Carlos.

A todos mis compañeros de la Maestría.

A todas las personas que de una u otra forma colaboraron para la realización de este trabajo.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xiv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	4
Recursos Marinos del Golfo de California.....	4
Especies de Valor Comercial.....	5
Especies Sub-utilizadas.....	6
Merluza del Pacífico como Recurso Pesquero.....	7
Distribución.....	10
Utilización.....	10
Defectos de Textura.....	11
Infestación muscular por parásitos.....	12
Proteinasas asociadas al ablandamiento.....	13
Aspectos Generales de la Hidrólisis Enzimática de Proteínas en Alimentos	14
Características del Enlace Peptídico	15

Ruptura Enzimática del Enlace Peptídico	16
Enzimas proteolíticas	18
Aplicación de enzimas proteolíticas	19
Fuente de enzimas proteolíticas	19
Sustrato de proteinasas.....	20
Proteína de soya.....	20
Proteína de leche	20
Proteína de pescado	22
Otras proteínas	22
Métodos para Monitorear Reacciones de Proteinasas	23
pH Stat	24
Grupos Aminos Libres (TNBS y OPA)	25
Otros Métodos	26
Aplicación de Hidrolizados en la Industria Alimentaria	26
Alimentación Animal	27
Alimentación Humana	29
Aplicaciones clínicas de los hidrolizados	30
Formulación de alimentos	32
Funcionalidad de Proteínas Parcialmente Hidrolizadas	33
Solubilidad	35
Emulsificación	37
Espumado	44
Viscosidad	51
Problemas Asociados a la Utilización de Hidrolizados en la Formulación de Alimentos para Consumo Humano	54

Problemas Asociados con el Sabor y Métodos para su Eliminación	54
Separación selectiva de péptidos amargos	56
Eliminación del sabor amargo mediante la reacción de plastelinas	56
Enmascarado del sabor amargo.....	57
Aplicación de exopeptidasas para eliminar sabor amargo	57
Aspectos de Salud Relacionados al Uso de los Hidrolizados en la Nutrición Humana.....	58
Desarrollo de Nuevos Productos	59
MATERIALES Y MÉTODOS	62
Obtención de la Materia Prima	62
Obtención de la Carne Molida	62
Análisis Químico	63
Actividad Proteolítica Endógena	63
Determinación del Grado de Hidrólisis (GH)	64
Cálculo de pK	65
Producción de Hidrolizados	66
Propiedades Funcionales de los Hidrolizados	68
Solubilidad en Agua	68
Capacidad Emulsificante (CE)	69
Índice de Actividad Emulsificante (IAE)	69
Índice de Estabilidad de la Emulsión (IEE).....	70
Capacidad Espumante (Cesp)	71
Estabilidad de la Espuma (EEsp)	71

Análisis Estadístico	72
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
Características de la Materia Prima	73
Composición Proximal	75
Actividad Proteolítica en Músculo de Merluza del Pacífico	76
Calibración del pH-Stat	85
Rendimiento del Proceso Hidrolítico.....	87
Solubilidad	89
Propiedades Emulsificantes	92
Propiedades Espumantes	102
CONCLUSIONES	111
BIBLIOGRAFIA	113

ÍNDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro		
1	Capturas anuales de merluza del Pacífico en el Golfo de California	9
2	Propiedades funcionales de las proteínas y sus aplicaciones en alimentos	34
3	Composición proximal de los hidrolizados producidos	76
4	Condiciones de pH y temperatura evaluadas para determinar las zonas de máxima actividad proteolítica en músculo de merluza del Pacífico	77
5	Efecto del grado de hidrólisis (GH) en la recuperación de proteína soluble	88
6	Efecto del pH y grado de hidrólisis (GH) sobre la capacidad espumante (CEsp) de hidrolizados de merluza del Pacífico	103
7	Matriz de correlación entre los efectos principales (pH y GH) y las propiedades funcionales evaluadas	110

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura	
1 Características morfológicas de merluza del Pacífico (<i>Merluccius productus</i>)	8
2 Procesos de desestabilización de emulsiones	41
3 Actividad proteolítica promedio (n=2) en músculo de merluza del Pacífico (<i>M. productus</i>) a varios pH's y temperaturas	78
4 Efecto del tipo de muestra de merluza del Pacífico (<i>M. productus</i>) sobre la actividad proteolítica a pH's ácido y diferentes temperaturas	80
5 Efecto del tipo de muestra de merluza del Pacífico (<i>M. productus</i>) sobre la actividad proteolítica a 50°C y pH alcalino-neutro	82
6 Efecto del tipo de muestra de merluza del Pacífico (<i>M. productus</i>) sobre la actividad proteolítica a 60°C y pH alcalino-neutro	83
7 Calibración del pH stat por el método TNBS	86
8 Efecto del pH y grado de Hidrólisis (GH) sobre la solubilidad (%) de hidrolizados de merluza del Pacífico	90
9 Efecto del pH y grado de Hidrólisis (GH) sobre la capacidad emulsificante (CE) de hidrolizados de merluza del Pacífico y su comparación con caseinato.....	94

10	Efecto del pH y grado de hidrólisis (GH) sobre el Índice de actividad emulsificante (IAE) de hidrolizados de merluza del Pacífico y su comparación con caseinato	98
11	Efecto del pH y grado de hidrólisis (GH) sobre el Índice de estabilidad emulsificante (IEE) de hidrolizados de merluza del Pacífico y su comparación con caseinato	100
12	Efecto del grado de hidrólisis (GH) y pH 4.0 sobre la estabilidad de la espuma (EEsp) de hidrolizados de merluza del Pacífico	105
13	Efecto del grado de hidrólisis (GH) y pH 7.0 sobre la estabilidad de la espuma (EEsp) de hidrolizados de merluza del Pacífico	106
14	Efecto del grado de hidrólisis (GH) y pH 10.0 sobre la estabilidad de la espuma (EEsp) de hidrolizados de merluza del Pacífico	107

RESUMEN

Se determinaron las condiciones de pH y temperatura de mayor actividad proteolítica en músculo de merluza del Pacífico; zonas de actividad máxima fueron detectadas a 50°C (pH 3.5-4.0) y a 60°C (pH 6.75-7.0). El grado aparente de parasitación tuvo un efecto significativo en la actividad enzimática a pH ácidos ($p < 0.05$), no así en el rango de pH 7.0-8.0.

Se elaboraron hidrolizados a partir de músculo de merluza del Pacífico con grado de hidrólisis del 5, 10, 15 y 20%. El hidrolizado con grado de hidrólisis del 5% se elaboró a 60°C (pH 7.0) haciendo uso de la actividad proteolítica muscular; para los grados de hidrólisis mayores se utilizó la preparación enzimática Alcalasa 0.6 L. La funcionalidad tecnológica de los hidrolizados se evaluó en términos de su solubilidad, capacidad de emulsificación, índice de actividad y estabilidad emulsificante, capacidad espumante y estabilidad de la espuma; los resultados fueron comparados con los de caseinato de sodio y seroalbúmina bovina.

El rendimiento del proceso hidrolítico aumentó ($p < 0.5$) con el grado de hidrólisis. La solubilidad de los hidrolizados fue del 100% para todos

los casos excepto para el grado de hidrólisis del 5% y pH 4, dando un valor de 82.67%.

El grado de hidrólisis y pH afectaron ($p < 0.001$) la capacidad emulsificante, observándose para cada grado de hidrólisis una tendencia a aumentar ($p < 0.05$) conforme el pH aumentó de 4 a 10. Fue evidente un mayor ($p < 0.05$) Índice de actividad y estabilidad emulsificante a pH 10, independientemente del grado de hidrólisis.

No se observó un efecto del grado de hidrólisis y del pH sobre la capacidad espumante. La mayor estabilidad espumante se obtuvo a pH 4 para el grado de hidrólisis del 5%; a medida que aumento el pH la diferencia en esta propiedad entre los hidrolizados tendió a disminuir. El pH ejerció, más que el grado de hidrólisis, un mayor efecto en la definición de la funcionalidad de los hidrolizados.

Las propiedades emulsificantes de los hidrolizados fueron similares a las del caseinato de sodio, sin embargo con una mayor capacidad emulsificante a pH 4.0 ($p < 0.05$). Los hidrolizados presentaron una menor capacidad espumante ($p < 0.05$) que la seroalbúmina bovina, no obstante el hidrolizado con grados de hidrólisis del 5% formó espumas más estables a pH 4 y similares a mayores pH.

Se demostró la factibilidad tecnológica de elaborar hidrolizados altamente funcionales a partir de la hidrólisis controlada del músculo de merluza del Pacífico, con características similares y bajo ciertas condiciones superiores a ingredientes y aditivos alimentarios de uso común. Mediante esta tecnología un recurso pesquero subutilizado, podría ser usado en la elaboración de alimentos para consumo humano.

INTRODUCCIÓN

El Golfo de California aloja una gran diversidad de especies marinas las cuales proveen proteína de buena calidad; sin embargo, muchas de ellas son subutilizadas por presentar inconvenientes tecnológicos que las hacen poco atractivas para su industrialización, siendo comúnmente procesadas a harina de pescado para alimentación animal.

En el noroeste de México, la merluza del Pacífico (*Merluccius productus*) es una de estas especies subutilizadas, ya que presenta problemas de infestación por parásitos que se manifiesta en una alta actividad proteolítica muscular resultando en una textura inaceptable y pérdida de funcionalidad de la proteína miofibrilar. Lo anterior limita su uso como alimento para consumo humano.

Las capturas anuales de merluza del Pacífico en el Estado de Sonora son en promedio de 30 ton, debido a que no existe una pesquería destinada a esta especie; se obtiene como fauna de acompañamiento de pesquerías comerciales.

Por otro lado, en las costas de los Estados Unidos y Canadá, la merluza del Pacífico presenta una gran disponibilidad con capturas anuales mayor de 200,000 ton; por sus características de color blanco y sabor suave, actualmente es una de las principales especies destinada a la producción de surimi.

Durante la elaboración del surimi, la actividad proteolítica presente en el músculo de merluza no es removida completamente, por lo que la degradación enzimática de los componentes miofibrilares disminuyen su calidad. Esto ha conducido al estudio de la inactivación de las proteinasas, utilizando inactivadores naturales como extractos de plantas, clara de huevo etc., o mediante la adición de agentes oxidantes para mejorar las propiedades funcionales del surimi producido.

Si bien el surimi es un ingrediente alimentario extremadamente versátil, la tecnología es cara, los insumos requeridos altos y los subproductos derivados abundantes. Su aplicación en México deberá ser cuidadosamente evaluada. Una alternativa tecnológica viable de uso de la especie en nuestro país, aprovechando incluso la actividad proteolítica presente en su músculo, es la producción de hidrolizados funcionales.

La hidrólisis enzimática es uno de los métodos mas ampliamente utilizados para la modificación y mejoramiento de la funcionalidad de proteínas. La producción de hidrolizados de proteína de pescado con características funcionales podrían, al igual que el surimi, ser utilizados como ingredientes y/o aditivos en una amplia gama de productos alimentarios.

Mediante la aplicación de esta tecnología, un recurso pesquero subutilizado podría ser utilizado en la elaboración de alimentos para consumo humano y de esta forma contribuir al desarrollo de la industria procesadora de productos pesqueros de la región.

En base a lo anterior los objetivos del presente trabajo fueron determinar las condiciones (pH y temperatura) de mayor actividad proteolítica

en músculo de merluza del Pacífico (*Merluccius productus*), producir hidrolizados aprovechando la actividad presente y mediante la adición de enzimas comerciales y evaluar la funcionalidad de los mismos mediante la comparación con ingredientes alimentarios altamente funcionales de uso común en la formulación de alimentos.

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Recursos Marinos del Golfo de California

La pesca y el consumo de productos marinos juega un papel importante a nivel mundial, debido principalmente a que mas de 2/3 de la superficie de la tierra se encuentra cubierta de agua, donde alrededor de 20,000 especies viven y se multiplican. Se estima que actualmente la pesquería comercial a nivel mundial, tiene una producción de tan solo el 1% del total de los recursos disponibles (Tilger, 1990).

El Golfo de California o Mar de Cortez, se encuentra localizado en la zona noroeste de México. Este, colinda con los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa. Esta zona constituye una de las áreas mas importantes del sector pesquero a nivel nacional por sus niveles de captura, industria y aporte económico.

El consumo de proteína de productos marinos forma una parte substancial de la dieta humana. En los años 70's, países como Japón y Korea del sur presentaron un consumo percapita diario de 45 y 70% respectivamente, del total de la proteína animal consumida; en México, el consumo de pescado es considerado bajo. A pesar que el estado de Sonora ocupó el primer lugar en la producción de productos marinos para 1987, presentó un consumo percapita aparente anual de solo 8 kg (Esquerria *et al.*, 1990).

Lo anterior representa una desventaja para el desarrollo pesquero, haciendo necesario incrementar la búsqueda de formas que propicien que los productos marinos constituyan parte de los hábitos alimentarios de la población mexicana. La utilización de especies masivas de bajo valor comercial, es una alternativa viable de utilización en la diversificación de la industria procesadora de productos marinos de la región.

Especies de Valor Comercial

A pesar de la gran disponibilidad de especies marinas, la carencia de un manejo apropiado de los recursos ha provocado una sobreexplotación de ciertas especies de valor comercial.

Las características sensoriales que presentan estas especies son las que definen su aceptación por el consumidor, como la de presentar poco hueso, carne blanca, sabor suave y una alta calidad sensorial (Tilger, 1990). Esto ocasiona una gran demanda sobre estas especies provocando un aumento en su precio. Lo anterior ha sido contrarrestado en parte por el desarrollo de la acuicultura. Actualmente, el cultivo de ostión, mejillón, almeja, camarón, carpa, bagre, tilapia, salmón etc., han tomado una gran importancia a nivel mundial y evitado en parte la sobreexplotación de especies comerciales.

La ventaja del cultivo de peces se debe a que estos son altamente eficientes en convertir alimento en proteína animal, ya que, al igual que las aves, por cada 1.5 kg de alimento los peces ganan 1 kg de peso corporal,

siendo en general esta conversión mayor que en los animales de matanza (Tilger, 1990).

Especies Sub-utilizadas

Algunas especies son sub-utilizadas debido a la imposibilidad de ser capturadas en cantidades comerciales y/o de reducida comercialización. Lo anterior dificulta el decidir cuales ofrecen oportunidades económicas realistas, por lo que las especies que deben ser consideradas como alternativa pesquera, son aquellas que tienen potencial para remplazar una pesquería tradicional (Toole, 1985).

El Golfo de California aloja una gran diversidad de especies marinas las cuales no se utilizan o aprovechan en forma adecuada, debido a inconvenientes tecnológicos que las hacen poco atractivas para su industrialización. Dentro las especies que son consideradas como sub-utilizadas, desde el punto de vista de su destino para consumo humano, se encuentra las sardinias principalmente los géneros Sardinops y Ophistonema. Estas especies presentan un alto contenido de lípidos, tamaño pequeño, alta proporción de músculo obscuro y un rápido deterioro postmortem. Por otro lado, merluza (*Merluccius productus*) y chano (*Chanus chanus*) se caracterizan por presentar problemas de textura, ocasionados principalmente por la alta actividad enzimática presente en su músculo. Lo anterior hace que estas y otras especies sean comúnmente destinadas a la producción de harina de pescado para alimentación animal.

Los problemas de desnutrición de la población, ha despertado el interés de tecnólogos marinos y nutriólogos para la realización de investigación que conduzca a establecer usos mas eficientes de las especies sub-utilizadas para destinarlas al consumo humano. La producción de concentrados de proteínas de pescado, fue uno de los primeros intentos realizados, sin embargo, las reducidas o nulas características funcionales que presentan ha limitado su utilización en la industria alimentaria (Marinou *et al.*, 1974; Yañez *et al.*, 1976). Actualmente, los estudios se han dirigido a mejorar las propiedades funcionales de los concentrados de proteína y de esta manera ampliar su utilización en alimentos (Sikorski y Nack, 1981).

Merluza del Pacífico como Recurso Pesquero

La merluza del Pacífico (*Merluccius productus*) también llamada Pacific hake o Pacific whiting, es una especie de la familia gadidae, de cuerpo y cabeza alargada, boca grande, dientes fuertes y filosos (Figura 1). Su peso llega a ser mayor de un kg, alcanzando tallas de 50 a 65 cm en el océano y de 30 a 45 cm en las bahías (Perkins, 1992; Chang-Lee, 1988), reportándose tallas record de alrededor de 92 cm (Chang-Lee, 1988). Esta especie es el recurso pesquero de mayor abundancia en las costas del noroeste de los

Los problemas de desnutrición de la población, ha despertado el interés de tecnólogos marinos y nutriólogos para la realización de investigación que conduzca a establecer usos mas eficientes de las especies sub-utilizadas para destinarlas al consumo humano. La producción de concentrados de proteínas de pescado, fue uno de los primeros intentos realizados, sin embargo, las reducidas o nulas características funcionales que presentan ha limitado su utilización en la industria alimentaria (Marinou *et al.*, 1974; Yañez *et al.*, 1976). Actualmente, los estudios se han dirigido a mejorar las propiedades funcionales de los concentrados de proteína y de esta manera ampliar su utilización en alimentos (Sikorski y Nack, 1981).

Merluza del Pacífico como Recurso Pesquero

La merluza del Pacífico (*Merluccius productus*) también llamada Pacific hake o Pacific whiting, es una especie de la familia gadidae, de cuerpo y cabeza alargada, boca grande, dientes fuertes y filosos (Figura 1). Su peso llega a ser mayor de un kg, alcanzando tallas de 50 a 65 cm en el océano y de 30 a 45 cm en las bahías (Perkins, 1992; Chang-Lee, 1988), reportándose tallas record de alrededor de 92 cm (Chang-Lee, 1988). Esta especie es el recurso pesquero de mayor abundancia en las costas del noroeste de los

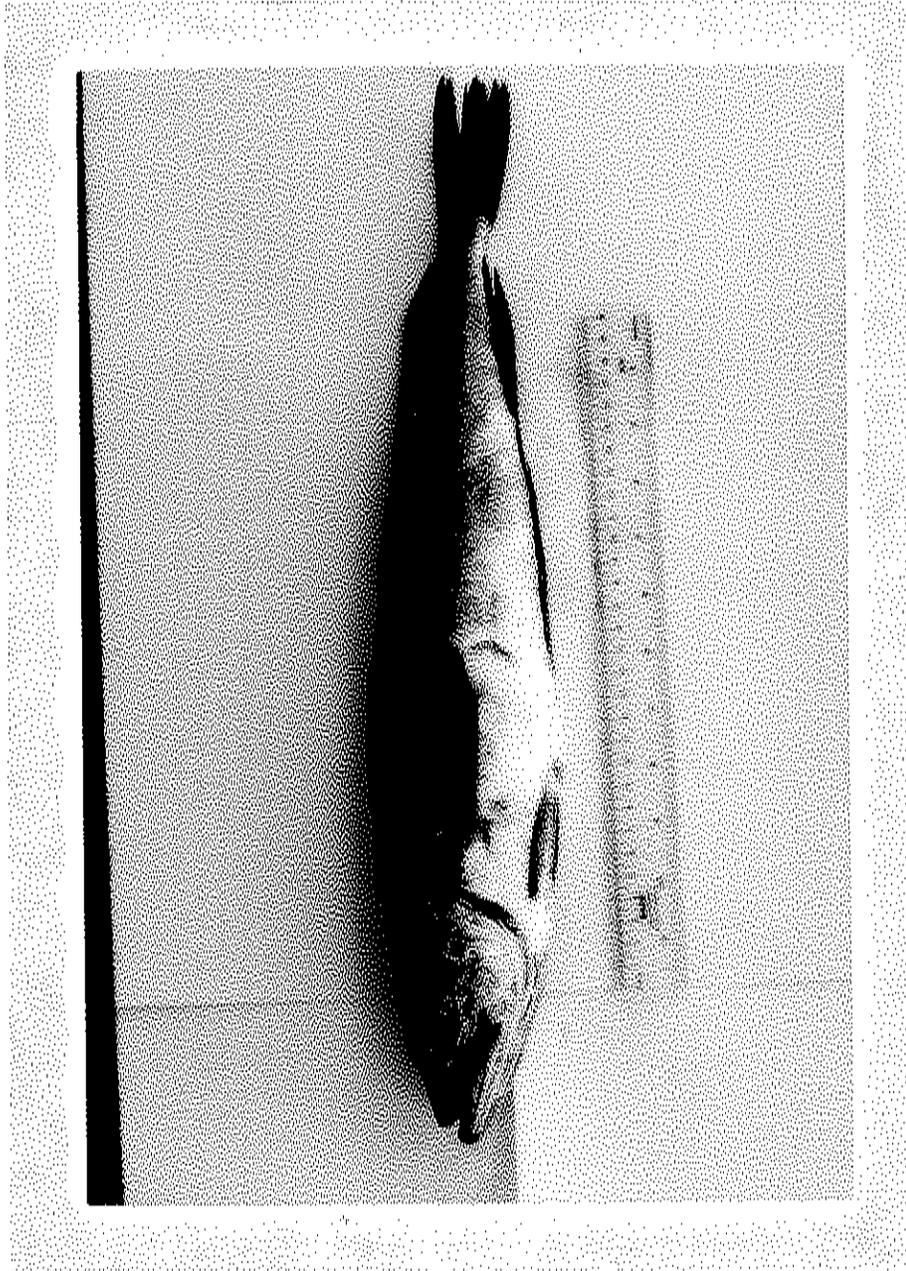


Figura 1. Características morfológicas de merluza del Pacífico
(*Merluccius productus*).

Estados Unidos, con capturas anuales de alrededor de 150,000 a 250,000 toneladas (Seymour *et al.*, 1994).

En las costas de México, básicamente en el Golfo de California, las capturas de merluza reportadas oficialmente para el estado de Sonora son de aproximadamente 30 ton anuales (Cuadro 1). Este bajo valor en capturas, no representa la biodisponibilidad del recurso, el que se ha estimado ser de 19,100 ton, localizado en las inmediaciones de la Isla Ángel de la Guarda al norte del golfo (Ehrhardt *et al.*, 1980).

Cuadro 1. Capturas anuales de merluza del Pacífico en el Estado de Sonora.

Año	Captura (Toneladas)
1991	130.6
1992	28.6
1993	14.3
1994	29.4
1995*	63.8

*Capturas de Enero a Septiembre.

Fuente: SEPESCA, 1995.

Las bajas capturas de merluza en el Golfo de California se debe principalmente a que no existe una pesquería destinada a esta especie, por su difícil comercialización y bajo valor comercial, siendo comúnmente destinada a la producción de harina de pescado para alimentación animal. Su pesca es obtenida como fauna de acompañamiento de la pesquería comercial y comúnmente se le denomina "basura". Por lo anterior es necesario definir alternativas de utilización de ésta y otras especies de bajo valor comercial mediante la elaboración de productos que sean destinados al consumo humano.

Distribución

La merluza del Pacífico es una especie de aguas frías y profundas; se encuentra distribuida desde el Golfo de California hasta el Golfo de Alaska, principalmente en las costas de California, Oregon, Washington y Columbia Británica (Chang-Lee, 1988). El período de captura comprende principalmente los meses de Junio a Octubre (Perkins, 1992).

Utilización

Hasta hace alrededor de 15 años era considerada como una especie sub-utilizada en Estados Unidos y Canadá, ya que su uso se destinaba a la producción de harina de pescado. Los problemas de ablandamiento muscular y pérdida de calidad son los factores que limitan su uso para consumo humano.

Para mantener una buena calidad del producto, una vez capturado debe ser rápidamente congelado o enhielado y ser procesado dentro de un tiempo no mayor de 4 días (Erickson *et al.*, 1983; Perkins, 1992; Tsuyuki *et al.*, 1982). El ignorar estos puntos, origina un producto de textura blanda y baja calidad, lo cual conduce al rechazo del consumidor.

Debido al descenso en la captura de abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*), principal especie utilizada en la elaboración de surimi, a la gran disponibilidad de merluza en las costas de Estados Unidos y Canadá, y a sus características de color blanco, sabor suave y bajo contenido de lípidos, se han realizado estudios conducentes a la utilización de esta especie como alternativa para la producción de surimi (Chan-Lee, 1988; Pacheco-Aguilar *et al.*, 1989; Pacheco-Aguilar, 1990).

Los problemas de textura que presenta el músculo de merluza, trajo consigo modificaciones en el proceso tradicional para la obtención de surimi de óptima calidad. La aplicación de inhibidores de proteinasa grado alimenticio, obtenidas a partir de extractos de papa, semillas y clara de huevo, así como agentes oxidantes, han logrado mantener y/o mejorar las características funcionales del surimi de merluza (Pacheco-Aguilar, 1990; Morrissey *et al.*, 1993; Seymour *et al.*, 1994).

Defectos de Textura

Los problemas de textura que presenta la merluza del Pacífico, es una de las causas principales que la hace poco atractiva para su industrialización.

El rápido ablandamiento muscular y su licuefacción durante un cocinado lento, debido principalmente a la alta actividad proteolítica, reduce su calidad y trae como consecuencia el rechazo del consumidor.

Infestación muscular por parásitos. La deterioración del músculo de merluza, es el resultado de la infestación muscular por una especie *myxozoan* del género *Kudoa*. De acuerdo a Kabata y Whitaker (1981), las especies que invaden el músculo de merluza del Pacífico son *Kudoa paniformis* y *Kudoa thyrisitis*; de estas dos especies, la primera es más virulenta y tiene un mayor efecto sobre la textura del músculo de merluza (Tsuyuki *et al.*, 1982; Wasson, 1992; Kudo *et al.*, 1987; Adlestein, 1991).

Las esporas del parásito pasan de un huésped a otro, solo cuando el primero de ellos muere. Una vez muerto, las enzimas proteolíticas degradan el músculo del pescado dejando libre las esporas (Adlestein, 1991).

El pez huésped es infectado directamente con las esporas del parásito que se encuentran en el agua (Adlestein, 1991). Cuando este invade la célula muscular se le denomina quiste; lo anterior provoca que el pez secrete melanina como un mecanismo de defensa, logrando envolver al quiste para formar un pseudoquiste o fibra muscular conteniendo al parásito (Tsuyuki *et al.*, 1982; Kudo *et al.*, 1987).

Se han establecido hipótesis de que las proteinasas responsables del ablandamiento muscular de merluza del Pacífico son de origen parasitario (Patashnik *et al.*, 1982; Kudo *et al.*, 1987); sin embargo, estas hipótesis han sido modificadas debido a la ausencia de organelos productores de enzimas en las esporas (Wasson, 1992; Seymour *et al.*, 1994), por lo que se cree que

la alta actividad proteolítica sea debida a una respuesta inmunológica a la espora myxosporidian (Erickson *et al.*, 1983).

Los factores que afectan la distribución del parásito en la población de merluza son la edad del huésped y el origen geográfico de las muestras. La prevalencia e intensidad de la parasitación, incrementa con la edad del pescado. De acuerdo a la distribución de la merluza, se ha encontrado un mayor grado de infestación de sur a norte, frente a las costas de Estados Unidos y Canadá (Tsuyuki *et al.*, 1982; Kudo *et al.*, 1987; Adlestein, 1991).

Proteinasas asociadas al ablandamiento. Las enzimas proteolíticas asociadas al ablandamiento muscular de merluza son de distintos tipos. Se ha reportado la presencia de proteinasas alcalinas en fluido sarcoplásmico de músculo de esta especie (Erickson *et al.*, 1983), así como la presencia de proteinasas activas a pH ácido y neutro (Tsuyuki *et al.*, 1982; Patashnik *et al.*, 1982).

Las catepsinas liberadas posmortem, son las responsables del ablandamiento muscular en muchas especies. Estas se encuentran en mayor cantidad en fagocitos y lisosomas, y participan en los mecanismos inmunológicos celulares inducidos por condiciones patológicas (Seymour *et al.*, 1994).

Estudios de caracterización enzimática con pH e inhibidores, han indicado que catepsina B es la enzima más activa en filetes de merluza del pacífico (An *et al.*, 1994), seguida de catepsina C, H y L. Estas al parecer, son las responsables de la degradación muscular (Erikson *et al.*, 1983; An *et al.*, 1994), siendo la catepsina L la que presenta mayor actividad en surimi, debido

a que no se remueve durante los lavados comprendidos en su procesamiento (Seymour *et al.*, 1994; An *et al.*, 1995).

Aspectos Generales de la Hidrólisis Enzimática de Proteínas en Alimentos

Varios alimentos como queso, salsa de soya, autolizados de pescado, etc., son alimentos cuyas proteínas son semidegradadas por la acción de enzimas proteolíticas. Estas enzimas pueden ser secretadas por microorganismos presentes en la materia prima o bien ser adicionadas. La hidrólisis enzimática no difiere del proceso bioquímico que sufren la proteínas por las proteinasas durante la digestión, por lo que ésta puede ser también llamada un proceso de predigestión (Adler-Nissen, 1986).

Los hidrolizados de caseína y soya se comercializaron por primera vez durante y después de la segunda guerra mundial. El hidrolizado de caseína fue utilizado en la formulación de alimentos dietéticos por su gran valor nutricional y el de soya en la industria de alimentos, por sus características funcionales de gran importancia tecnológica.

La aplicación de proteinasas o enzimas proteolíticas es una metodología comúnmente utilizada para el mejoramiento de las propiedades funcionales de las proteínas en los alimentos. Esta modificación no daña el valor nutricional, no es tóxica y puede ser específica, además la utilización de enzimas en alimentos es aceptado por el público.

La selección de los parámetros de hidrólisis es de gran importancia para lograr este mejoramiento y mantener una calidad uniforme. La falta de control en el proceso hidrolítico puede afectar otras propiedades como la formación de péptidos amargos, con gran influencia en el sabor del producto final (Feher y Halász, 1989; Smith y Brekke, 1984). El grado de hidrólisis, el cual es definido en función del porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados, sirve como el parámetro de control para la reacción (Adler-Nissen, 1977).

Características del Enlace Peptídico

Las proteínas están estructuradas por monómeros llamados aminoácidos. La literatura reporta 175 aminoácidos diferentes existentes en la naturaleza, sin embargo, solo 20 de ellos son comúnmente encontrados en las proteínas (Anglemier y Montgomery, 1985).

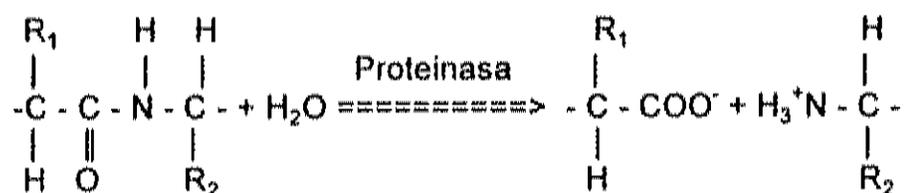
El grupo "R" del aminoácido (cadena lateral), representa una estructura compleja y diferente para cada aminoácido. Este grupo puede estar cargado o no, ser polar o no polar, alifático o aromático e hidrofílico o hidrofóbico. Estas propiedades tienen un impacto sobre la estructura y función de la proteína (Anglemier y Montgomery, 1985; Badui, 1984).

Los péptidos y las proteínas son el producto de la unión heterogénea de aminoácidos a través de enlaces peptídicos, que se forman por una condensación entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro, con la consecuente eliminación de una molécula de agua. Se ha encontrado que el enlace C-N, dentro del enlace peptídico, tiene carácter de

doble ligadura (40%), por lo que es más estable (400J/mol) debido a la resonancia que existe entre los átomos O-C-N. Lo anterior impide a los aminoácidos rotar libremente dentro de la estructura proteica (Anglemier y Montgomery, 1985; Badui, 1984).

Ruptura Enzimática del Enlace Peptídico

La hidrólisis de enlaces pepticos de una proteína comúnmente es catalizada por enzimas proteolíticas:



La susceptibilidad de una proteína para el ataque de proteinasas está relacionada a su estructura o niveles de organización como lo son su estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

La mayoría de las reacciones catalizadas por proteinasas (serinas) se da en tres pasos: 1) La formación de un complejo de Michaelis-Menten, entre la cadena peptídica original (sustrato) y la enzima, 2) El rompimiento del enlace peptídico para liberar uno de los dos péptidos resultantes y 3) Un ataque nucleofílico sobre el complejo para la liberación del otro péptido y reconstituir la enzima libre (exopeptidasas y endopeptidasas), rindiendo

diferentes productos finales. De esta manera se puede elegir la enzima que origine los productos de hidrólisis deseados (Badui, 1984; Adler-Nissen, 1986).

La ruptura de enlaces peptídicos ocasiona una serie compleja de eventos que alteran la funcionalidad de las proteínas, a saber: 1) Un incremento en el número de grupos ionizables ($-\text{NH}_3^+$, $-\text{COO}^-$), incremento hidrofílico y de carga neta (Mahmoud *et al.*, 1992; Mahmoud, 1994), 2) Un decremento en el tamaño molecular de la cadena polipeptídica, con una resultante pérdida de su antigenicidad y 3) Una alteración de la estructura molecular que conduce a la exposición de regiones hidrofóbicas al ambiente acuoso (Mahmoud, 1994; Mahmoud *et al.*, 1992; Adler-Nissen, 1986).

Enzimas Proteolíticas

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones con alto grado de especificidad y eficiencia. Se encuentran presentes en todo organismo vivo y son responsables de catalizar la mayoría de las reacciones que tienen lugar en la célula (Wray, 1988; Haard, 1990). Las enzimas son obtenidas de plantas, animales y microorganismos mediante la utilización de solventes adecuados (Haard, 1992b;1993).

Las enzimas proteolíticas son clasificadas de diferentes formas; una se basa en los requerimientos de pH (proteinasas ácidas, alcalinas y neutras), otra por la habilidad para hidrolizar proteínas específicas (queratinasas, colagenasas, elastasas, etc.) (Löffler, 1986; Asghar y Bhatti, 1987). También en base a su origen, como las enzimas del páncreas (tripsina y quimotripsina),

del estómago (pepsina y renina), de la papaya (papaína), etc., o de acuerdo al tipo de sustrato (proteinasas y peptidasas) (Asghar y Bhatti, 1987; Haard, 1992b).

La clasificación más satisfactoria para estudiar las enzimas proteolíticas es la basada en su mecanismo de acción sobre diferentes sustratos. Esta clasificación es utilizada por la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (Löffler, 1986; Badui, 1984) y consiste de cuatro grupos: serina, thiol, metal (o inhibidas por quelación con metales) y proteinasas ácidas, las cuales son distinguidas por su sensibilidad a varios inhibidores (Asghar y Bhatti, 1987; Haard y Simson, 1994).

El extenso número en el tipo de proteinasas hizo necesaria su clasificación en dos grupos mayoritarios: exopeptidasas y endopeptidasas. Las exopeptidasas son enzimas proteolíticas que hidrolizan enlaces peptídicos a partir del grupo amino o carboxilo terminal, mientras que las enzimas endopeptidasas hidrolizan enlaces en una cadena polipeptídica distante a los aminoácidos terminales. Sin embargo, estas últimas no poseen absoluta especificidad y pueden en ocasiones hidrolizar en menor grado enlaces terminales (Asghar y Bhatti, 1987).

Aplicación de enzimas proteolíticas. Las proteinasas son las enzimas de mayor uso, representando en 1985 alrededor de un 60% del total de las enzimas utilizadas en la industria alimentaria (Tood y Kinsella, 1988; Haard, 1992a). Entre los principales usos que se les da en esta industria es el auxiliar en el procesamiento de los productos, incluyendo: un buen horneado, manufactura de quesos, ablandamiento de carne, desarrollo de sabor,

eliminación de turbidez en vinos y cerveza, obtención de extractos de sabor, hidrolizados proteicos, etc. (Wray, 1988; Löffler, 1986; Haard, 1992a). En fechas recientes, la industria pesquera las ha utilizado para la remoción de piel, membranas y escamas (Stefansson, 1988; Haard, 1992a, 1995; Haard y Simpson, 1994).

Existen dos tipos de enzimas asociadas con los alimentos; las enzimas naturales (endógenas) y las que son añadidas (exógenas) en el proceso para lograr una modificación en el producto final (Baduí, 1984). La elección de enzimas para ser aplicadas en la industria, depende de factores tales como especificidad catalítica, pH óptimo, estabilidad, actividad molecular, estabilidad térmica, sensibilidad a inhibidores específicos o sustancias inhibitoras como el NaCl, etc. (Haard, 1993). Por ejemplo, la tripsina de pescado es muy inestable a pH ácido y estable a pH alcalino en contraste con la tripsina de mamíferos; otro ejemplo es la renina utilizada en la elaboración de quesos, la cual tiene una estrecha especificidad por los enlaces Phe-Met de la k-caseína (Haard, 1993; Haard y Simpson, 1994).

Fuente de enzimas proteolíticas. Las enzimas utilizadas en la industria alimentaria varían desde las provenientes de vegetales, como papaína, ficina y bromelina (Iturbe-Chiñas y López-Munguía, 1986; Haard, 1992a; Löffler, 1986), las de organismos marinos y animales como pepsina, tripsina, quimotripsina, etc., las provenientes de fuentes microbianas (Haard, 1992a; 1992b Löffler, 1986), así como enzimas producidas mediante la tecnología del DNA recombinante presentando una gran especificidad a sustratos y características de estabilidad (Gusek y Kinsella, 1988; Lofler, 1986).

Sustrato de proteinasas. El sustrato utilizado por las proteinasas son las proteínas, las cuales pueden provenir de fuentes vegetal, animal o microbiológica. La hidrólisis enzimática de proteínas en los alimentos generalmente resulta en profundos cambios de la proteína tratada. Frecuentemente estos cambios destruyen su funcionalidad, sin embargo, en algunos casos, la hidrólisis provee un medio para impartirle propiedades funcionales a las proteínas (Shimizu *et al.*, 1986). Estos hidrolizados pueden cumplir con ciertas características que la industria alimentaria requiere para su utilización (Adler-Nissen y Olsen, 1979).

Proteína de soya. El uso de la proteína de soya se ha incrementado en la fabricación de productos alimentarios tales como carnes procesadas; sin embargo, el uso amplio en otro tipos de alimentos requiere mayor investigación de sus propiedades superficiales bajo condiciones experimentales (Yu y Damodaran, 1991b).

Los hidrolizados de proteína de soya fueron una de las primeras proteínas mejoradas a nivel comercial, mediante el uso de enzimas. Actualmente es uno de los productos más utilizados por la industria alimentaria por sus características funcionales (Adler-Nissen, 1986).

Proteína de leche. La producción de hidrolizados de caseína, la proteína principal de la leche, fue uno de los primeros hidrolizados disponibles comercialmente para la elaboración de dietas especiales por su gran valor nutritivo (Adler-Nissen, 1986). Además, la actividad emulsificante de estos hidrolizados es mayor que la caseína y mucho mayor que la de las proteínas del suero (Chobert *et al.*, 1988).

Actualmente varios procesos de hidrólisis han sido patentados para la elaboración de sustitutos de huevo a partir de proteínas lácteas (Kuehler y Stine, 1974).

El suero lácteo es un subproducto líquido en la manufactura de queso y caseína; éste, recientemente ha sido considerado como un efluente del proceso (Leiras *et al.*, 1991). Los concentrados de proteína de suero, son utilizados ampliamente en la formulación para infantes y enfermos con terapia alimenticia. Poseen buenas características de solubilidad, sin embargo su habilidad para estabilizar emulsiones y espumas es muy reducida (Turgeon y Gauthier, 1990). Presentan además una falta de homogeneidad en composición y una variabilidad en sus propiedades funcionales, limitando con ello su utilización (Phillips *et al.*, 1990).

Tratamientos con calor a pH ácido han modificado sus propiedades funcionales, debido a que este tratamiento causa desnaturalización sin agregación, lo que resulta en un mejoramiento de las propiedades espumantes, solubilidad, viscosidad y gelificación (Turgeon y Gauthier, 1990), siendo la habilidad espumante su principal característica funcional reconocida por muchos años (Kuehler y Stine, 1974).

La hidrólisis enzimática ha logrado en parte mejorar las propiedades funcionales de las proteínas del suero (Monty y Jost, 1978). En años recientes, se ha incrementado el interés en mejorar y desarrollar nuevos métodos para utilizar los componentes del suero del queso (Leiras *et al.*, 1991).

Proteína de Pescado. El proceso de producción de hidrolizados de proteína de pescado (HPP), normalmente involucra una hidrólisis limitada de la materia prima con proteinasas como la ficina o papaína, inactivación de la enzima, filtración del hidrolizado, concentración y secado por aspersion del filtrado (Sikorski y Naczk, 1981)

La falta de control en el proceso hidrolítico trae como consecuencia la formación de péptidos hidrofóbicos de sabor amargo (Haard, 1992a; Adler-Nissen y Olson, 1979; Sikorski y Naczk, 1981; Quaglia y Orban, 1987); sin embargo, la hidrólisis de proteína de pescado no presenta problemas serios a este respecto, por lo que quizás ésta sea un punto a favor para que los HPP sean producidos a gran escala para ser utilizados en formulación de alimentos (Adler-Nissen, 1976)

Los HPP tienen un alto contenido de aminoácidos esenciales, por lo que son utilizados en dietas como componentes valiosos debido a que aumentan la utilización de proteínas de otras fuentes (Sikorski y Naczk, 1981; Baca *et al.*, 1991). Estos se han utilizado como sustitutos de leche, saborizantes de caldos (Haard, 1992a; Baca *et al.*, 1991), sopas, bebidas, formulaciones para infantes (Hale, 1969) y en la fortificación de dietas terapéuticas donde a los pacientes se les ha prescrito un alimento líquido (Gusek y Kinsella, 1988).

Otras Proteínas. Existen otra gran diversidad de proteínas que han sido modificadas enzimáticamente, con la finalidad de mejorar sus propiedades funcionales; tal es el caso de la proteína del maíz (Behnke *et al.*, 1989; Splitter y Shipe, 1976), trigo (Caldwell, 1980; Kato *et al.*, 1991), frijol (Deshpande y

Nielsen, 1987; Romero y Ryan, 1978;), cacahuete (Sekul y Ory, 1977), girasol (Parrado *et al.*, 1991), así como proteínas de origen animal (Ledward y Lawrie, 1984; Smith y Brekke, 1984; Shahidi *et al.*, 1994).

Métodos Para Monitorear Reacciones de Proteinasas

Existe una gran diversidad de métodos para monitorear la acción de enzimas proteolíticas, los cuales utilizan proteínas y compuestos sintéticos como sustratos (Whitaker, 1994).

Un método ampliamente utilizado para monitorear la actividad proteolítica, es el cambio de solubilidad de una proteína en ácido tricloroacético (TCA) (Liu y Pigott, 1981; Kim *et al.*, 1990; Bernardi *et al.*, 1991; Hoyle y Merritt, 1994; Whitaker, 1994). En este método, los compuestos solubles pueden ser determinados midiendo la absorbancia a 280 nm, o mediante reacciones coloridas utilizando el método Lowry o Biuret (Whitaker, 1994). El método es rápido y preciso; sin embargo, no mide el número de enlaces peptídicos que fueron hidrolizados, por lo que no se recomienda para estudios detallados (Whitaker, 1994).

Lo anterior ha conducido al desarrollo de métodos más precisos, los cuales comúnmente se utilizan en estudios o procesos que involucran hidrólisis de proteínas. La hidrólisis de proteínas es un proceso que requiere de un control preciso en el grado de hidrólisis para lograr un producto con características de calidad uniforme.

Debido a la importancia de estos métodos en la elaboración de hidrolizados, algunos de ellos son descritos brevemente a continuación:

pH Stat

El pH stat es un método ampliamente utilizado en el control de la hidrólisis de proteínas (Shahidi *et al.*, 1994; Baca *et al.*, 1991; Turgeon *et al.*, 1991; Behnke *et al.*, 1989; Adler-Nissen, 1986). El método es simple, rápido, reproducible y no destructivo. Su principio se basa en que los aminoácidos poseen al menos un grupo amino primario (-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH). El grado de ionización de estos grupos durante la hidrólisis va a depender del pH de la reacción y del pK de ionización (Adler-Nissen, 1986).

La hidrólisis de proteína está acompañada de una liberación o consumo de grupos ⁺H. El control de la hidrólisis, se lleva a cabo manteniendo el pH constante, pero debido a la liberación de grupos carboxilos y aminos durante la hidrólisis, se requiere de un gasto de ácido o base para mantener el pH, excepto en la región de pH 5-6 donde la liberación y consumo de protones se cancelan exactamente uno a otro (Adler-Nissen, 1986).

Cuando el pH se mantiene constante (ej. pH 8.0), se obtiene una relación proporcional entre los equivalentes de enlace peptídicos hidrolizados y los equivalentes de base consumida. Esta constante de proporcionalidad es el grado de disociación (α), de los grupos amino (⁺H₃N-), donde:

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}}$$

El pK promedio de los productos de hidrólisis puede ser determinado en forma independiente, mediante la determinación de los grupos aminos que son liberados durante la hidrólisis, (ver sección de materiales y métodos, procedimiento del ácido trinitrobencilsulfónico (TNBS)).

La ecuación que relaciona el grado de hidrólisis (GH) al consumo de base está dado por:

$$\%GH = B \times N_b \times (1/\alpha) \times (1/MP) \times (1/H_{tot}) \times 100$$

donde:

B= Consumo de base en mL o L N_b =Normalidad de la base

α = Grado de disociación promedio de los grupos α -amino

MP= Masa de proteína ($N \times F_N$) en g o kg

h_{tot} = Numero total de enlaces peptídicos en la proteína (meqv/g de proteína).

La utilización del pH stat en hidrólisis de proteínas, requiere ser estandarizado utilizando métodos precisos (valores absolutos) (TNBS o OPA) para obtener valores estimados, confiables (Turgeon *et al.*, 1991).

Grupos Aminos Libres (TNBS y OPA)

La determinación del grado de hidrólisis de la proteína por métodos precisos (absolutos) y no estimados, se obtiene mediante la cuantificación de los grupos aminos libres por métodos químicos. Entre los métodos más

comunes están el de la reacción con el ácido trinitrobencilsulfónico (TNBS) y el o-phthaldialdehído (OPA). Estos métodos difieren principalmente en la rapidez, tipo de interferencias, así como el grado de peligrosidad de los reactivos que utilizan (Turgeon *et al.*, 1991).

Otros Métodos

Existen otros métodos para determinar el grado de hidrólisis de proteínas los cuales son poco utilizados. Tal es el caso del método de titulación del formaldehído (Kuehler y Stine, 1974; Mahmoud *et al.*, 1992), el método fluorométrico de la fluorescamina (Turgeon *et al.*, 1991), etc. Entre los métodos que pueden aplicarse durante el procesamiento están la viscosimetría (Adler-Nissen y Olsen, 1979; Mahmoud, 1994) y osmometría (Nijpels *et al.*, 1980; Mahmoud, 1994), los cuales presentan un gran potencial para ser utilizados como el pH stat en la producción de hidrolizados de proteína.

Aplicación de Hidrolizados en la Industria Alimentaria

La hidrólisis enzimática de proteínas es un método disponible para la recuperación de proteínas de subproductos o excesos de la industria alimentaria. Para la industria pesquera en particular, es una alternativa viable para la utilización de especies marinas de bajo valor comercial las cuales comúnmente son sub-utilizadas o no aprovechadas (Karmas y Lauber, 1987; Haard, 1992a).

La proteólisis o hidrólisis enzimática de proteínas tiene un efecto sobre el valor nutricional y propiedades funcionales de las proteínas nativas. En algunos casos, este efecto puede ser benéfico, mientras que en otros puede disminuir la calidad y aceptación de los alimentos (Gusek y Kinsella, 1988; Mahmoud *et al.*, 1992; Haard, 1992a). Los hidrolizados de proteínas deben presentar características de funcionalidad que la industria alimentaria requiere, para su aplicación en la formulación de alimentos. Estas pueden variar dependiendo del tipo de alimento que se desee elaborar, así como del destino que se le va dar al mismo, ya sea para consumo humano o animal.

Alimentación Animal

Actualmente existen una gran diversidad de hidrolizados de proteínas, siendo los más comunes, los de soya, suero de leche y de pescado. Los hidrolizados y concentrados de proteína que carecen de funcionalidad, comúnmente se utilizan en la formulación de dietas para alimentación animal, aportando únicamente el componente nutricional. Su utilización es reducida y poco deseable en la formulación de alimentos donde se requiere de cierta funcionalidad (Baca *et al.*, 1991).

La elaboración de ensilados de pescado data desde la segunda guerra mundial. Su proceso de elaboración consiste en almacenar con ácido los desechos de pescado o especies de bajo valor comercial, que mediante la acción de las enzimas a bajos pH producen rápidamente un producto líquido, el cual sirve como suplementación de proteína en la alimentación de animales (Gildberg, 1993; Raghunath y McCurdy, 1991).

Las peptonas son productos obtenidos de la degradación de proteínas; estas comúnmente se utilizan como medio de cultivo para el desarrollo de microorganismos. La proteína utilizada para su producción proviene del desecho de los lugares de matanza, no obstante la fuente principal de peptonas de alta calidad es la caseína. Debido a la expansión de la biotecnología, se ha originado un incrementado en la demanda de sustratos para el desarrollo de microorganismos los cuales son aplicados en procesos biotecnológicos (Gildberg *et al.*, 1989; Sripathy *et al.*, 1962). Lo anterior ha llevado a la preparación de hidrolizados de pescado ricos en peptonas a partir de especies de bajo valor comercial mediante la adición de enzimas (Gildberg *et al.*, 1989; Sen *et al.*, 1962; Sripathy *et al.*, 1962).

Estudios nutricionales realizados en Francia sobre la elaboración de sustitutos de leche descremada, han logrado remplazar dos terceras partes de la proteína de leche para lechones con hidrolizados de proteína de pescado, sin detectar efectos negativos en el desarrollo y/o eficiencia del alimento en los animales, debido a las características nutricias que presentan las proteínas de pescado (Adler-Nissen, 1986; Baca *et al.*, 1991).

Actualmente, los desechos y subproductos de la industria procesadora de productos pesqueros (agua del lavado, agua de cola, músculo oscuro, etc.) son recuperados y destinados comúnmente a la alimentación animal (Nakajima *et al.*, 1992; Tarky *et al.*, 1973). Este uso ha sido cuestionado y es tema de estudio, ya que los compuestos de bajo peso molecular derivado de la hidrólisis de las proteínas presentes en esos subproductos, pueden ser utilizados para la producción de aminoácidos, extractos y sasonadores (Nakajima *et al.*, 1992).

Alimentación Humana

Los hidrolizados de proteína disponibles comercialmente para uso en alimentos, aparecieron durante la segunda guerra mundial, en dos diferentes contextos: Hidrolizados de caseína utilizados en alimentos dietéticos y proteína de soya modificada con pepsina, presentando en forma ideal cada uno de ellos las cualidades deseadas de valor nutricional y propiedades funcionales para el primero y segundo respectivamente. El significado del valor nutricional del primero es obvio, mientras que las propiedades funcionales del segundo poseen importancia tecnológica en la elaboración de alimentos (Adler-Nisen, 1986).

Actualmente, la producción de productos fermentados de pescado, tienen una gran aceptación en el sureste de Asia, siendo la salsa de pescado (Nampla) el producto fermentado de mayor tradición. Este es elaborado a partir de pescados pequeños o de desecho, utilizando una alta concentración de sal y almacenándolo por largos períodos (6-12 meses), durante el cual las enzimas proteolíticas actúan produciendo una solución rica en pequeños péptidos y aminoácidos libres (Chaveesuk *et al.*, 1993; Gildberg, 1993; McIver *et al.*, 1982).

La salsa de pescado, es utilizada como condimento para mejorar el sabor, aroma y contenido nutricional de platillos de arroz. Actualmente se estima una producción anual de 250,000 tons de este producto solo en el sureste de Asia (Chaveesuk *et al.*, 1993; Gildberg, 1993). Una limitante en su producción, es el largo período de almacenamiento durante su elaboración (6-12 meses); sin embargo, se ha logrado reducir este tiempo a 2 meses, mediante la adición

de preparados enzimáticos sin afectar la calidad del producto (Chaveesuk *et al.*, 1993).

La hidrólisis de proteínas es efectiva para destruir interacciones y enlaces entre ciertas proteínas y compuestos no deseables. Estas proteínas en forma nativa podrían no ser utilizadas por presentar características que las hacen indeseables al consumidor, por su olor, color y sabor, así como por la presencia de factores tóxicos o anti-nutricios que disminuirían su aprovechamiento (García-Chacon *et al.*, 1990).

Los hidrolizados de proteínas con propiedades funcionales bien definidas, pueden cumplir con ciertas funciones que la industria alimentaria requiere para su utilización. Sin embargo, un uso amplio de hidrolizados de proteínas en los alimentos, requiere de un control cuidadoso del sabor y la funcionalidad de los productos durante su hidrólisis y subsecuente procesamiento, para obtener un producto de calidad reproducible (Adler-Nissen y Olsen, 1979).

Aplicaciones clínicas de los hidrolizados. La aplicación de hidrolizados de proteína en formulación de dietas para uso clínico, inició en los años 40's. Su función era mantener el estado nutricional de pacientes que por diversas razones, no podían consumir proteínas intactas (Adler-Nissen, 1986; Mahmoud *et al.*, 1992; Schmidl *et al.*, 1994). Actualmente son utilizados en tratamientos de pacientes con enfermedad de Crohn's, síndrome del intestino corto, fístulas, pancreatitis, traumas severos y alergias alimentarias (Schmidl *et al.*, 1994; Mahmoud, 1994).

Los hidrolizados de proteína de pescado tienen un alto contenido de aminoácidos esenciales, por lo que son utilizados en dietas como componentes valiosos debido a que aumentan la utilización de proteínas de otras fuentes (Sikorski y Naczek, 1981; Baca *et al.*, 1991). Estos, se utilizan en la fortificación de dietas terapéuticas donde a los pacientes se les ha prescrito un alimento líquido (Gusek y Kinsella, 1988). Sin embargo, problemas de sabor amargo pueden producir el rechazo de algunos pacientes cuando estos productos son ingeridos por la boca (Adler-Nissen, 1986; Schimidl *et al.*, 1994).

Se han realizado estudios de elaboración de hidrolizados bajos en fenilalanina utilizados en el tratamiento de pacientes con problemas de fenilcetonuria. Este proceso consiste en un tratamiento con carbón activado o resinas de intercambio iónico después de la hidrólisis, con lo cual se ha logrado eliminar en un 92% el contenido inicial de fenilalanina (López-Bajonero *et al.*, 1991) y compuestos de sabor amargo (Adler-Nissen, 1986).

Otra aplicación clínica de los hidrolizados es el diseño de fórmulas para infantes alérgicos, a partir de la hidrólisis de proteínas del suero o caseína. En este caso, una hidrólisis extensiva es esencial para hacer que los productos resultantes no presenten actividad inmunológica (Mahmoud *et al.*, 1992)

Todo lo anterior es de gran importancia para la industria procesadora de productos marinos, ya que la producción y aplicación de hidrolizados de proteína de pescado en la formulación de alimentos de alta calidad nutricia, es una oportunidad de aprovechar recursos pesqueros de bajo valor comercial en la alimentación humana.

Formulación de alimentos. Las propiedades funcionales de los hidrolizados son importantes desde el punto de vista de la tecnología de alimentos, ya que estas propiedades se van a manifestar en el alimento contribuyendo a su sabor, textura y apariencia final (Kinsella, 1976).

Mediante las modificación y el control de las condiciones de hidrólisis de proteínas, es posible obtener hidrolizados con propiedades funcionales, en algunos casos mejores que la proteína original (Shimizu *et al.*, 1986; Quaglia y Orban, 1987; Adler-Nissen y Olson, 1979), que puedan ser aprovechadas por la industria alimentaria. Entre estas se pueden mencionar: solubilidad, capacidad emulsificante y espumante (Adler-Nissen y Olsen, 1989; Shimizu *et al.*, 1986).

La elaboración de hidrolizados funcionales requiere de un control en el proceso hidrolítico. El grado de hidrólisis (GH) es el parámetro de control para obtener una calidad funcional reproducible (Adler-Nissen, 1986; Mahmoud, 1994).

Entre las propiedades funcionales más importantes de las proteínas se encuentra la solubilidad, viscosidad, emulsificación, espumeo, gelación y atributos del sabor. Estas son comunes en proteínas intactas pero pueden ser modificadas mediante la hidrólisis enzimática. Estas nuevas propiedades van a depender en gran medida del tamaño molecular o grado de hidrólisis (Adler-Nissen, 1986; Mahmoud *et al.*, 1992; Mahmoud, 1994).

Los péptidos pueden ser utilizados como ingredientes alimentarios durante la elaboración y procesamiento de alimentos; lo anterior requiere información sobre las propiedades funcionales que estos imparten como

resultado de la hidrólisis enzimática de las proteínas originales (Chobert *et al.*, 1989; Shimizu *et al.*, 1986; Mahmoud *et al.*, 1992).

Varias aplicaciones de hidrolizados se han desarrollado exitosamente a nivel comercial, aprovechando las características fisicoquímicas que presentan. Entre estas aplicaciones se encuentra la elaboración de bebidas carbonatadas (Olsen y Adler-Nissen, 1979; Adler-Nissen, 1986; Frokjaer, 1994), bebidas para deportistas (Frokjaer, 1994), productos embutidos (Vallejo-Cordoba *et al.*, 1986; Satterlee *et al.*, 1973), aderezos para ensalada, mayonesas (Gauthier *et al.*, 1993), merengues (Kuehler y Stine, 1974), suplementación de proteínas (Yañez *et al.*, 1976; Marinou *et al.*, 1974), etc., todas con características aceptables.

Funcionalidad de Proteínas Parcialmente Hidrolizadas

La industria alimentaria se encuentra en constante búsqueda de nuevas proteínas que pudiesen ser utilizadas como ingredientes en la manufactura de alimentos, por las características fisicoquímicas que presentan (Kinsella, 1976; Arteaga *et al.*, 1993).

Las propiedades funcionales de las proteínas dependen de factores intrínsecos tales como composición, conformación y homogeneidad de la fuente de proteína, así como por los métodos de procesamiento y condiciones ambientales (Badui, 1984; Nakai *et al.*, 1991; Kinsella, 1976).

Las proteínas son los componentes esenciales en los alimentos por sus características nutricionales y funcionales. El Cuadro 2 muestra las características funcionales más importantes de las proteínas y su aplicación en alimentos: como características funcionales importantes se han mencionado: solubilidad, capacidad emulsificante, habilidad de atrapar agua y/o grasa, propiedad espumante y desarrollo reológico (Giese, 1994; Saterlee, 1981).

Cuadro 2. Propiedades funcionales de las proteínas y su aplicación en alimentos.

Función	Aplicación
Nutrición	Fórmulas para infantes, alimentos enriquecidos con proteína
Solubilidad	Bebidas, alimentos líquidos o húmedos
Viscosidad	Sopas, salsas, aderezos para ensaladas, yoghurt
Absorción de Agua	Productos cárnicos y marinos, horneados, yoghurt
Adhesión/Cohesión	Carnes, embutidos, pasta, horneados
Emulsificación	Emulsiones, aderezos para ensalada, salsas, horneados
Espumado	Confitería, horneados, betún, merengues, postres congelados

Fuente: Giese, 1994.

Del uso potencial que tienen las enzimas en la industria alimentaria, la hidrólisis enzimática es la tecnología más ampliamente utilizada para la modificación de proteínas y mejoramiento de sus propiedades funcionales

(Chobert *et al.*, 1988; Adler-Nissen, 1986). Los péptidos producidos tienen un menor peso y tamaño molecular, menor estructura secundaria que las proteínas nativas por lo que puede esperarse que incrementen su solubilidad cerca del punto isoelectrico, presenten una menor viscosidad en solución/suspensión y significantes cambios en sus propiedades superficiales (Gauthier *et al.*, 1993).

No obstante estos péptidos pueden ser utilizados en la producción de alimentos, sin embargo existe poca información sobre sus propiedades funcionales (Chobert *et al.*, 1988; Shimizu *et al.*, 1986; Gauthier *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1987a; 1987b). Las características funcionales de los hidrolizados, van a estar definidos por el tipo de proteína hidrolizada y la estructura y composición de los péptidos resultantes. Debido a la importancia de las propiedades funcionales en la formulación de alimentos, algunas de estas son descritas a continuación.

Solubilidad

La solubilidad de las proteínas es reconocida como la propiedad que tiene mayor influencia en el comportamiento de la molécula proteica y que afecta sus otras propiedades.

Entre los factores que afectan esta propiedad se encuentra el pH, temperatura, disolventes y fuerza iónica (Badui, 1984).

La solubilidad es un reflejo del balance de cargas e hidrofobicidad de la molécula proteica, lo cual afecta su interacción con el solvente y con otras

moléculas de proteína (Nakai *et al.*, 1991). Por otro lado, la desnaturalización de proteínas implica en algunos casos pérdida de funcionalidad, la cual se manifiesta comúnmente como pérdida de solubilidad, reduciendo de esta forma sus propiedades surfactantes (Kinsella, 1976)

Las propiedades funcionales que presenten los hidrolizados en un rango amplio de pH, es de gran importancia ya que van a definir en gran medida su uso potencial en la formulación de alimentos (Badui, 1984). El proceso hidrolítico de proteínas produce péptidos altamente solubles, encontrándose que a medida que aumenta el grado de hidrólisis la solubilidad aumenta. Los productos formados por la hidrólisis tienden a ser solubles en el punto isoeléctrico (pH 4-5), donde la mayoría de las proteínas generalmente precipitan (Olsen y Adler-Nissen, 1979; Shimizu *et al.*, 1986; Quaglia y Orban, 1987; Kim *et al.*, 1990; Frokjaer, 1994), debido a su menor estructura y a la generación de nuevos grupos amino y carboxilos, resultado del rompimiento del enlace peptídico (Mahmoud, 1994; Adler-Nissen, 1986).

Estudios asociados a la solubilidad y propiedades superficiales de los polipéptidos resultantes de la hidrólisis son necesarios para un mejor entendimiento de su comportamiento en un sistema alimentario (Shimizu *et al.*, 1986). El estudio de las propiedades funcionales de los productos, obtenidos por hidrólisis de proteínas, generalmente van acompañados de la determinación de solubilidad a distintos pH. Lo anterior debido a la gran importancia que tienen actualmente estos ingredientes en la industria alimentaria, siendo la solubilidad la propiedad que va a definir en gran medida el desarrollo de las otras propiedades.

Emulsificación

Se ha postulado que la solubilidad es una de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas e hidrolizados, sin embargo la polaridad y la hidrofobicidad juegan también un papel relevante en la funcionalidad de estos compuestos (Nakai *et al.*, 1991). Diversos estudios han reportado una correlación de estas propiedades con la habilidad de emulsificar y estabilizar emulsiones, sin embargo, otros investigadores señalan que no existe tal correlación (Voutsinas *et al.*, 1983).

Las emulsiones son sistemas dispersos conteniendo dos fases distintas; una fase continua y una segunda fase que se encuentra dispersada en pequeñas gotas (Schuck, 1976; Halling, 1981). Las proteínas y los polipéptidos obtenidos de la hidrólisis de proteínas, actúan como emulsificantes reduciendo la tensión superficial entre las dos fases, evitando así su separación.

El proceso de absorción de la proteína o polipéptido a la interface durante la emulsificación, se cree que se realiza en tres fases: 1) la proteína nativa soluble se difunde a la región de contacto, 2) penetra a la interface aceite:agua y 3) ocurre un cambio superficial donde la proteína absorbida toma un nuevo arreglo insertando grupos hidrofóbicos en el aceite para formar un estado de energía libre más favorable, lo cual resulta en la formación de una película proteica que rodea los glóbulos de grasa (Chobert *et al.*, 1988; Fligner y Mangino, 1991; Smith y Brekke, 1984).

La solubilidad de proteínas es un requisito importante para la formación de la película proteica, debido a que es crítica la rápida migración y absorción en la interfase (Chober *et al.*, 1988). Igualmente importante son la flexibilidad conformacional, hidrofobicidad y viscoelasticidad de la película interfacial (Fligner y Mangino, 1991).

Las propiedades emulsificantes de las proteínas como ingredientes en los alimentos han sido discutidas y evaluadas en términos de su capacidad emulsificante, actividad emulsificante, estabilidad emulsificante, etc. Varios métodos se han desarrollado para medir estos índices, difiriendo algunos en sus principios, además de presentar factores que influyen en la evaluación.

La capacidad emulsificante (CE) se mide como la máxima cantidad de aceite que es emulsificado bajo condiciones específicas para una cantidad de proteína estándar (Schut, 1976; Halling, 1981; Hamm, 1986). La cantidad de aceite requerida por la solución proteica para cambiar la emulsión de aceite en agua (O/W) a agua en aceite (W/O), es considerada como la capacidad emulsificante. Esta propiedad es afectada por la concentración de proteína, solubilidad, pH del medio, concentración de sucrosa y cloruro de sodio (Schuct, 1976), además de factores externos como el diseño del equipo, velocidad del homogenizador, tamaño del contenedor, velocidad de adición del aceite, tipo de aceite, etc. (Pearce y Kinsella, 1978).

Varios métodos se han utilizado para detectar el cambio de fase de la emulsión durante la determinación de la CE, entre los que se encuentran la observación visual, cambios de viscosidad, utilización de colorantes solubles en aceite y el más aceptado, la aplicación de un voltímetro (Weeb *et al.*,

1970). En este último, un aumento abrupto en la resistencia al paso de la corriente es detectado como el cambio de fase, lo cual indica que la capacidad de la proteína para emulsificar aceite ha sido excedida (Halling, 1981; Pearce y Kinsella, 1978).

El valor de CE no representa una propiedad única de la proteína bajo prueba, sino una propiedad del sistema de emulsión, equipo y método utilizado. No relaciona la cantidad de proteína o emulsificante requerido para producir una emulsión satisfactoria, cuando la cantidad de aceite es menor que el requerido para la inversión de fase (Schuct, 1976; Pearce y Kinsella, 1978).

El Índice de actividad emulsificante (IAE) es otra metodología para evaluar las propiedades emulsificantes de proteínas. Esta técnica expresa la propiedad en unidad de área interfaseal estabilizada por unidad de peso (m^2/g).

Las diferencia más importante entre la IAE y CE, es que la primera se basa en la relación de la turbidez de una emulsión y su área interfaseal, la cual se encuentra relacionada a la habilidad de la proteína para absorber y estabilizar la interfase aceite-agua; en este método el radio proteína:aceite en la formación de la emulsión se mantiene constante para todas las muestras. En la determinación de CE la solución de proteína es titulada con aceite hasta el rompimiento de la emulsión.

Otra propiedad emulsificante de las proteínas es el índice de estabilidad de emulsión (IEE). Desde el punto de vista operacional, una emulsión estable (EE) es cuando el desarrollo de separación de fases como el cremado,

floculación y/o coalescencia en un producto (Figura 2), se manifiestan en forma lenta (Halling, 1981). Estos procesos pueden ocurrir por separado o en forma conjunta (Pearce y Kinsella, 1978; Halling, 1981).

Toda definición de estabilidad emulsificante (EE) establece que el rompimiento de cualquier emulsión, independientemente del proceso, depende de la temperatura, fuerza gravitacional y concentración de aceite en la emulsión (Fligner y Manguino, 1991; Pearce y Kinsella, 1978). La EE se mide en cantidad de aceite o crema separada de una emulsión durante cierto período, mantenida a una temperatura y fuerza gravitacional determinada (Huber y Regenstein, 1988; Hamm, 1986).

La capacidad de una proteína para estabilizar una emulsión se relaciona al área interfaseal que está cubierta por la proteína disponible, donde la estabilidad va a estar relacionada a la constancia de esa área interfaseal, principio en el cual se base el índice de estabilidad emulsificante (IEE).

La literatura reporta extensivamente la evaluación de propiedades emulsificantes de proteínas por diferentes métodos y en diferentes condiciones (Pearce y Kinsella, 1978; Schut, 1976; Halling, 1981). La extrapolación de datos de un método a otro es casi imposible. Para tener una aceptación y uso universal, es necesario determinar propiedades básicas de las proteínas bajo condiciones específicas y utilizar estas para explicar y predecir propiedades funcionales (Pearce y Kinsella, 1978; Li-Chan *et al.*, 1984).

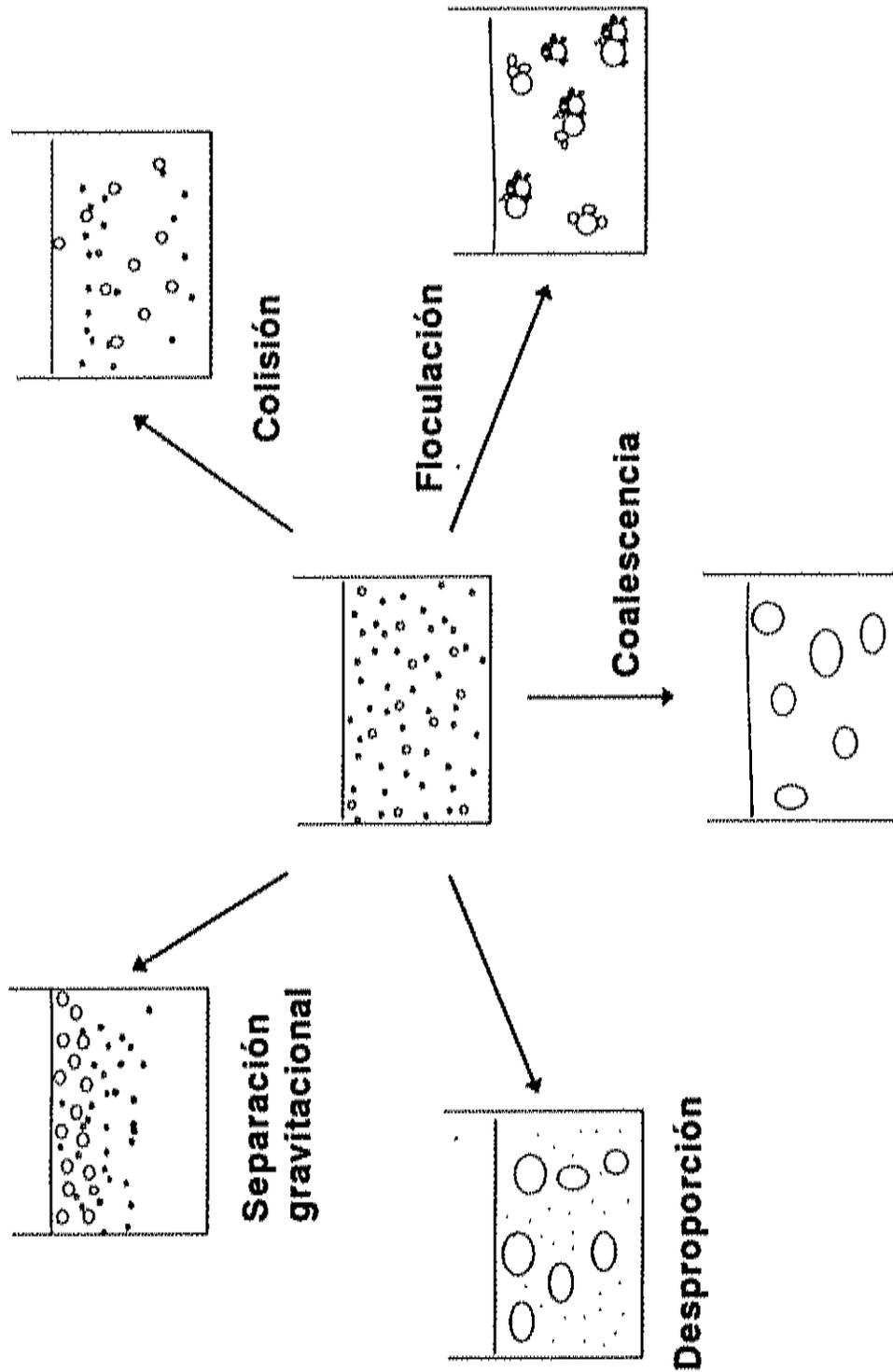


Figura 2. Procesos de destabilización de emulsiones.

Fuente: Halling, 1981.

La modificación de proteínas generalmente involucra tratamientos con calor, cambios de pH, alquilación e hidrólisis enzimática, lo cual trae como consecuencia cambios en su conformación y estructura, modificando sus propiedades fisicoquímicas. Estas modificaciones resultan, en ocasiones, en una mejora de las propiedades emulsificantes de la proteína tratada (Voutsinas *et al.*, 1981; Shimizu *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1987a,b; Chobert *et al.*, 1988; Parris, *et al.*, 1991). Este mejoramiento se debe al aumento de grupos hidrofóbicos disponibles, los cuales fácilmente pueden orientarse a la interface aceite:agua y mejorar sus propiedades emulsificantes. Sin embargo, debe considerarse que ciertas alteraciones en la estructura de las proteínas pueden producir cambios drásticos en su conformación, que pueden reflejarse en resultados no esperados (Fligner y Mangino, 1991).

Actualmente, los estudios sobre propiedades funcionales de las proteínas en alimentos han puesto mucho énfasis en las propiedades superficiales espumantes y emulsificantes, debido a que son elementos críticos en el desarrollo del uso de nuevas proteínas en la formulación de alimentos (Kato, 1991). A este respecto, algunos investigadores solo relacionan estructura con función (Nakai *et al.*, 1991), mientras que otros, solo composición con función (Fligner y Mangino, 1991).

A pesar de que solubilidad es una característica importante para la capacidad emulsificante de emulsiones cárnicas, esta no es un buen predictor de las propiedades funcionales en general (Li-Chan *et al.*, 1984). Varios estudios han apoyado que la hidrofobicidad superficial de proteínas es el factor importante estructural que gobierna sus propiedades funcionales (Kato, 1991). La hidrofobicidad de proteínas es una variable estructural comúnmente

utilizada para predecir la funcionalidad de proteínas en alimentos, tales como su habilidad emulsificante y espumante. Sin embargo los datos publicados de hidrofobicidad de proteínas no son consistentes, debido a los diferentes principios en que se basan los métodos empleados (Nakai *et al.*, 1991).

Diversos estudios han utilizado los parámetros de solubilidad (*s*) o hidrofobicidad superficial (*S_o*) para predecir propiedades funcionales de proteínas, obteniéndose buenas correlaciones. El uso conjunto de ambos parámetros (*s* y *S_o*), resulta en predicciones más exactas para las propiedades emulsificantes, espumantes y gelificantes (Voutsinas *et al.*, 1983; Li-Chan *et al.*, 1984; Arteaga *et al.*, 1993; Arteaga y Nakai, 1993).

Aunque se ha reportado una buena correlación entre la capacidad emulsificante e hidrofobicidad de las proteínas, Chobert *et al.*, (1988), señalan que la habilidad emulsificante de las proteínas depende también de la distribución de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos de la cadena polipeptídica, como en el caso de la miosina (Schut, 1976). Por otro lado, ha sido reportado que la propiedad de emulsificación está relacionada a la accesibilidad de grupos hidrofóbicos en la superficie, más que en el número total de grupos hidrofóbicos presentes (Fligner y Mangino, 1991).

Gauthier *et al.* (1993), reportan correlaciones entre actividad superficial y longitud de la cadena del péptido, estableciendo, en forma general, que un péptido debe tener una longitud mínima de 20 residuos para poseer buenas propiedades emulsificantes e interfaseales.

Las características superficiales que presentan los péptidos resultantes de la hidrólisis de proteínas son muy complejas pudiéndose encontrar un

efecto sinergista entre ellos, (Shimizu *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1987a; 1987b). Esto hace necesario realizar estudios mas detallados del comportamiento de los polipéptidos resultantes de la hidrólisis enzimática de proteína.

Espumado

La propiedad espumante de las proteínas es una característica requerida para su utilización en cierto tipo de productos alimentarios como merengues, bombones, postres congelados y productos de panificación.

Las espumas al igual que las emulsiones, son un sistema disperso, formado por dos fases distintas. Una fase líquida (agua) continua rodeando a una fase dispersa (aire), donde las proteínas (surfactantes) se acumulan en la interfase aire-agua (Halling, 1981). La característica del desarrollo interfaseal de las proteínas refleja las interacciones físicas, las cuales están influenciadas por la composición y conformación de la proteína en solución y la interfase aire:agua (Waniska y Kinsella, 1979; Phillips *et al.*, 1990).

Debido a la importancia de las características espumantes de las proteínas en la industria alimentaria, se han realizado una gran variedad de estudios para examinar el desarrollo espumante de proteínas bajo diferentes condiciones (Kinsella, 1976). Estos estudios han demostrado que diferentes factores tales como pH, temperatura, presencia de sales, lípidos y fuente de proteína, afectan el desarrollo espumante (Phillips *et al.*, 1990). Otras investigaciones han sido dirigidas a estudiar la relación de las propiedades espumantes con las propiedades físicas y químicas superficiales como

presión, concentración, elasticidad y viscosidad (Althea-Ann y Nakai, 1983; Yu y Damodaran, 1991a, 1991b; Zhu y Damodaran, 1994).

El método utilizado para la formación de la espuma es el de mayor efecto sobre esta propiedad de la proteína evaluada. En base a ello, varios métodos se han utilizado para producir y caracterizar espumas formadas por proteínas; los más comunes son batido, agitación y aeración. La diferencia, más importante entre estos, es la cantidad de proteína utilizada y la forma como es formada la espuma (Halling, 1981; Waniska y Kinsella, 1979).

El primero ha sido preferido para la mayoría de las evaluaciones de espumeo de las proteínas. Este método produce espumas que pueden ser medidas por el incremento en el volumen de la espuma, gravedad específica y/o viscosidad (Halling, 1981). Sin embargo, la gran cantidad de proteína requerida (3-40%), el incremento de temperatura de la solución durante el batido y la falta de conocimiento del proceso de formación de espuma limita su uso en estudios básicos (Halling, 1981; Waniska y Kinsella, 1979).

El segundo se realiza mediante una rápida agitación de una solución proteica (1%) contenida en un cilindro graduado, midiendo el volumen de la espuma producida. La cantidad de proteína utilizada por este método es menor, sin embargo como en el método anterior, el rápido movimiento incrementa la temperatura de la solución proteica. En este método, el volumen de la espuma producida está limitada por las dimensiones del contenedor mientras que en los otros métodos no (Halling, 1981; Waniska y Kinsella, 1979).

El tercer método es el de aereación, este se realiza mediante la inyección de gas a través de un solución proteica que se encuentra en una columna con un filtro poroso fijo en el fondo, generando de esta forma más rápidamente la espuma. Este procedimiento es muy reproducible ya que el tamaño de la burbuja es uniforme (Halling, 1981). El equipo de aereación puede ser modificado para mantener la solución de proteína y la espuma en la columna a la temperatura deseada. De igual forma, puede adaptarse a cantidades pequeñas de proteína (0.01-2%), por lo que es muy adecuado para estudios básicos (Halling, 1981; Ferreira *et al.*, 1995; Yu y Damodaran, 1991a, 1991b). La capacidad espumante puede ser determinada por el radio entre el volumen del gas en la espuma, el volumen de gas esparcido o por el máximo volumen de espuma y el flujo del gas (Waniska y Kinsella, 1979).

Para que una proteína presente buenas características surfactantes debe poseer dos propiedades moleculares, una perteneciente a su capacidad espumante y otra relacionada a su estabilidad (Yu y Damodaran, 1991a, 1991b). Desde el punto de vista operacional la habilidad de una proteína para formar espuma es esencial, tanto como su estabilización. El conocimiento del mecanismo involucrado en la estabilidad de la espuma es reducido (Yu y Damodaran, 1991a).

Durante la formación de la espuma, la fuerza de corte está involucrada en los tres métodos. En el método de agitación y batido, la espuma es formada y rota por la fuerza de corte utilizada; en el método de aereación la ruptura de la burbuja es solo función del grosor y viscoelasticidad de la membrana interfaseal. (Waniska y Kinsella, 1979).

Una de las limitaciones para entender los eventos microscópicos y macroscópicos que llevan al colapso de la espuma, es la carencia de métodos disponibles para estudiar la cinética de la desestabilización de espumas. Varios métodos han sido desarrollados para estudiar la estabilidad de espumas; entre ellos se cuentan: drenado de líquido (Waniska y Kinsella, 1979; Baldwin y Sinthavala, 1974; Ferreira *et al.*, 1995), decaimiento del volumen de la espuma (Althea-Ann y Nakai, 1983), conductividad de espumas (Kato *et al.*, 1983), así como técnicas fotográficas (Anderson *et al.*, 1987).

La medición del líquido drenado de la fase laminar de la espuma es el más utilizado, pero provee solo una ilustración cruda de la estabilidad de la espuma. Además, el drenado no es el único factor responsable para el rompimiento de la espuma. La medida del rango de decaimiento del área interfaseal de las espumas, es una variable más fundamentada que proporciona mayor información sobre los procesos microscópicos que afectan su estabilidad (Yu y Damodaran, 1991b). Los procesos microscópicos involucrados en la estabilidad de espuma, son el drenado gravitacional del líquido y la desproporción en tamaño de las burbujas, debido a la difusión de gas interburbujas. La magnitud de estos eventos son afectados por el pH, temperatura y presencia de agentes reductores (Yu y Damodaran, 1991a), además de la viscoelasticidad de las películas proteicas (Yu y Damodaran, 1991b; Zhu y Damodaran, 1994).

Debido a la necesidad de desarrollar métodos que involucren a los factores moleculares responsables de la estabilidad de espumas proteicas, Yu y Damodaran (1991a) evaluaron un método basado en rigurosos principios físicos. Estos investigadores monitorearon los cambios de presión en función

del tiempo en un sistema cerrado conteniendo la espuma. Mediante la conversión de la disminución del área interfaseal de la espuma en función del tiempo, estimaron el área superficial inicial de la espuma, estableciendo que esta es afectada por factores como pH, temperatura y agentes reductores.

Se ha demostrado que la capacidad espumante de las proteínas está relacionada con su habilidad para formar películas en la interfase aire/agua (Yu y Damodaran, 1991a). Las proteínas que son rápidamente absorbidas, desdobladas y capaces de formar un rearrreglo molecular en la interfase aire:agua, presentan un mejor espumado que las que se absorben lentamente y resisten un desdoblamiento en la interfase (Yu y Damodaran, 1991a; Zhu y Damodaran, 1994).

La solubilidad, alta hidrofobicidad, viscosidad y moderada dispersibilidad de proteínas, están asociadas a una óptima capacidad espumante, siendo la hidrofobicidad y viscosidad los parámetros más importantes en la estabilidad de la espuma formada (Althea-Ann y Nakai, 1983).

Por otra parte, la literatura reporta que proteínas que presentan buen espumado, al parecer no poseen propiedades moleculares que den estabilidad a la espuma, mientras que aquellas que no poseen flexibilidad molecular para formar espumas, parecen impartir propiedades de estabilidad (Yu y Damodaran, 1991a). Durante la formación de espumas, las proteínas desarrollan cambios conformacionales en la superficie mediante su desdoblamiento, exponiendo más regiones hidrofóbicas y facilitando la asociación entre polipéptidos. De esta forma se incrementa la viscosidad de la

membrana, aumentando la estabilidad de la espuma. Sin embargo, una fuerte asociación entre ellos puede resultar en el rompimiento de la espuma debido a la pérdida de elasticidad de la membrana (Althea-Ann y Nakai, 1983). Resultados en la literatura han demostrado que proteínas con mayor flexibilidad muestran mejores características espumantes que aquellas rígidas. Lo anterior indica que la molécula de proteína debe ser suficientemente flexible para extenderse a la interfase aire:agua, para estabilizar las nuevas celdas de aire y de esta manera prevenir el colapso de la espuma (Althea-Ann y Nakai, 1983).

La hidrofobicidad superficial de las proteínas es una característica importante para la propiedad emulsificante. A pesar de no explicar las características espumantes, es una propiedad necesaria ya que una alta densidad de carga desestabiliza las espumas de proteínas (Althea-Ann y Nakai, 1983).

En estudios de espumado con seroalbúmina bovina (SAB) y ovoalbúmina, se encontró que proteínas en solución cerca de su punto isoeléctrico, al perder su carga eléctrica, se orientan en la interfase aire:líquido, acomodándose una sobre otra (Yu y Damodaran, 1991a; Waniska y Kinsella, 1979), incrementando con ello el grosor de la película, viscosidad superficial y potencial elástico de la membrana, lo cual se manifiesta en óptimas propiedades espumantes.

La relación entre solubilidad de proteínas y su desarrollo espumante también es muy complejo. Varios estudios sugieren correlaciones entre

formación de espuma y solubilidad de proteína, señalando que la estabilidad está dada por la parte insoluble (Halling, 1981; Zhu y Damodaran, 1994).

Especies monoméricas presentan un mayor coeficiente de difusión, por lo que migran rápidamente, se absorben, desdoblan y forman una película en la interfase aire:agua más fácilmente que especies poliméricas. Estas últimas absorbidas a la película preformada incrementa las propiedades viscoelásticas de la membrana; de esta forma las especies monoméricas contribuyen a la formación de la espuma y las poliméricas contribuyen a la estabilidad contra el drenado y difusión de gas interburbujas (Zhu y Damodaran, 1994). Esto ha motivado al desarrollo de métodos para modificar proteínas, dirigidos al mejoramiento de sus propiedades funcionales (Kinsella, 1976; Adler-Nissen, 1986).

La hidrólisis enzimática ha logrado mejorar las características espumantes de proteínas. A este respecto, los hidrolizados de soya ocuparon un lugar importante en la industria alimentaria durante la segunda guerra mundial, al presentar características de capacidad y estabilidad espumante requerida para sustituir la escasez de clara de huevo (Adler-Nissen, 1986).

Teniéndose un control en el proceso hidrolítico, la capacidad espumante de hidrolizados proteicos puede ser mayor que la proteína nativa. Sin embargo, ésta hidrólisis debe ser limitada ya que la estabilidad de la espuma disminuye con una hidrólisis continua (Althea-Ann y Nakai, 1983).

Otros métodos de modificación de proteínas como la succinilación, han aumentado la capacidad espumante de concentrados de proteína de pescado

(CPP) (Baldwin y Sinthavala, 1974) y otras proteínas (Kinsella, 1976), haciéndolas atractivas para la industria alimentaria.

Viscosidad

Las proteínas juegan un papel importante en la textura final de los alimentos; su desarrollo funcional depende de sus características fisicoquímicas las cual se ven alteradas durante el procesamiento.

La viscosidad de un fluido es una medida de la fricción o resistencia interna que las sustancias tienen para fluir libremente y es altamente dependiente de las características superficiales de las partículas dispersas (Powrie y Tung, 1976).

La viscosidad y las propiedades espumantes de las proteínas presentan una buena correlación, debido a que ambas son dependientes del tamaño molecular, forma, flexibilidad, grado de hidratación e interacciones intermoleculares (Althea-Ann y Nakai, 1983). La viscosidad de las proteínas, depende de la concentración y del tipo de proteína (Sathe y Salunkhe, 1981; Cofrades *et al.*, 1993; Rha y Pradipasena, 1986).

En soluciones proteicas diluidas y ausencia de interacciones, la viscosidad depende solo del tamaño y forma molecular (Cofrades *et al.*, 1993; Rha y Pradipasena, 1986), presentando un comportamiento newtoniano cuando presentan una relación proporcional entre el esfuerzo cortante aplicado (fuerza de corte) y la rapidez de corte (rango de corte) a través del coeficiente de viscosidad del fluido en cuestión (Powrie y Tung, 1976; Badui, 1984). Por otro

lado, en soluciones proteicas concentradas, la viscosidad es dependiente de la concentración, presentando un comportamiento no-newtoniano que se manifiesta en propiedades viscoelásticas debido a las interacciones intermoleculares (Rha y Pradipasena, 1986; Xiong, 1994).

Existen varios tipos de equipo instrumental para medir viscosidad desde simples a muy complejos. Estos se basan en diferentes principios incluyendo rotación, flotación, pruebas de vibración y flujo capilar (Novo, 1986).

El termino "viscosidad dinámica" es definido como el ratio de la fuerza de corte entre el rango de corte y este es utilizado para describir las características de flujo. Sin embargo esta puede ser compleja dependiendo de los atributos intrínsecos de la proteína tales como peso molecular, tamaño, volumen, forma, carga superficial y facilidad de deformación, así como factores extrínsecos como pH, temperatura, fuerza iónica, tipo de ion y rapidez de corte. Por lo que el término "viscosidad aparente", es utilizado en la literatura para definir el comportamiento de flujo de suspensiones de proteínas musculares (Xiong, 1994).

Las proteínas miofibrilares tienen diferentes propiedades funcionales dependiendo de factores intrínsecos, ambientales y de procesamiento. Dentro de estas propiedades, la viscosidad es importante debido a que está involucrada en muchos procesos de manufactura de alimentos. Además, provee información sobre interacciones fisicoquímicas entre proteínas, indicando cambios estructurales que pueden ocurrir en la molécula (Cofrades *et al.*, 1993).

La viscosidad se ha utilizado para determinar el grado de desnaturalización de proteínas y su agregación durante almacenamiento en congelación. Esta determinación ha sido considerada un índice más seguro para evaluar la calidad funcional de las proteínas de pescado que el utilizar solubilidad o capacidad emulsificante (Cofrades *et al.*, 1993).

La viscosidad o resistencia al flujo de un material proteico, tiene el potencial de estar relacionado con el grado de hidrólisis en la solución de proteína. Una disminución en viscosidad dentro de ciertos límites puede correlacionarse razonablemente con la disminución del peso molecular (Adler-Nissen y Olsen, 1979). Este fenómeno ha sido utilizado como un método para describir una variedad de enzimas hidrolíticas. Por ejemplo, la reducción de viscosidad ha sido utilizada en cervecerías para medir la modificación de malta en el mosto (Novo, 1986).

Los cambios de viscosidad en un proceso hidrolítico son más dramáticos en los estados iniciales de hidrólisis, lo que le confiere a este método un mayor potencial para ser utilizado para la evaluación de grado de hidrólisis bajos. De igual forma, su rapidez y sencillez le permite el ser utilizado para hacer mediciones en línea del proceso. A pesar de que se dan cambios de viscosidad en estados de hidrólisis avanzados, estos no pueden ser medidos fácilmente (Novo, 1986).

La viscosidad se ha utilizado para determinar el grado de desnaturalización de proteínas y su agregación durante almacenamiento en congelación. Esta determinación ha sido considerada un índice más seguro para evaluar la calidad funcional de las proteínas de pescado que el utilizar solubilidad o capacidad emulsificante (Cofrades *et al.*, 1993).

La viscosidad o resistencia al flujo de un material proteico, tiene el potencial de estar relacionado con el grado de hidrólisis en la solución de proteína. Una disminución en viscosidad dentro de ciertos límites puede correlacionarse razonablemente con la disminución del peso molecular (Adler-Nissen y Olsen, 1979). Este fenómeno ha sido utilizado como un método para describir una variedad de enzimas hidrolíticas. Por ejemplo, la reducción de viscosidad ha sido utilizada en cervecerías para medir la modificación de malta en el mosto (Novo, 1986).

Los cambios de viscosidad en un proceso hidrolítico son más dramáticos en los estados iniciales de hidrólisis, lo que le confiere a este método un mayor potencial para ser utilizado para la evaluación de grado de hidrólisis bajos. De igual forma, su rapidez y sencillez le permite el ser utilizado para hacer mediciones en línea del proceso. A pesar de que se dan cambios de viscosidad en estados de hidrólisis avanzados, estos no pueden ser medidos fácilmente (Novo, 1986).

Problemas Asociados a la Utilización de Hidrolizados en la Formulación de Alimentos para Consumo Humano

La hidrólisis enzimática es un método atractivo para lograr la modificación de proteínas; sin embargo, el uso de hidrolizados por la industria alimentaria puede estar limitado por el desarrollo de sabores amargos o por la carencia de propiedades funcionales de los mismos (Fujimaki *et al.*, 1970; Adler-Nissen, 1986). Una proteólisis prolongada, intensiva o no controlada, puede resultar en la formación de péptidos altamente solubles, completamente afuncionales y con problemas de sabor (Adler-Nissen, 1976; Pedersen, 1994; Quaglia y Orban, 1987).

Problemas Asociados con el Sabor y Métodos para su Eliminación

Las características de sabor amargo que presentan algunos hidrolizados, es una de las limitantes más importantes para su aplicación en la formulación de alimentos. Los hidrolizados de proteína de soya y caseína frecuentemente presentan este problema. Debido a la importancia comercial que presentan los hidrolizados, se han realizado estudios sobre la reducción, prevención o remoción del sabor amargo en el producto elaborado (Pedersen, 1994; Ney, 1979; Arai *et al.*, 1972; Fujimaki *et al.*, 1970). El problema de sabor amargo, parece ser más pronunciado en hidrolizados con un mayor grado de hidrólisis, mientras que la hidrólisis limitada lo previene (Adler-Nissen, 1976).

De acuerdo a la teoría de Ney, el sabor amargo de los péptidos obtenidos de la hidrólisis de proteínas, está relacionado con la hidrofobicidad de los residuos de aminoácidos que forman el péptido. Esta característica es expresada con el valor Δf , que es la energía libre (cal/mol) requerida para transferir la cadena lateral del aminoácido de etanol a agua (Ney, 1979).

La hidrofobicidad media (valor Q) de un péptido, es obtenido de la sumatoria de las hidrofobicidades de los diferentes aminoácidos que lo forman, dividido por el número de residuos ($Q = \sum \Delta f / n$). Péptidos con valor Q arriba de 1400, son amargos y por abajo de 1300 no lo son. Sin embargo, este principio es válido únicamente para péptidos con pesos moleculares menores de 6,000 Da. Algunos aminoácidos son la excepción a estos valores, ya que lisina, prolina y fenilalanina no presentan sabor amargo a pesar de tener un valor Δf mayor de 1400 (Ney, 1979; Adler-Nissen, 1986).

Las proteínas no presentan sabor, pero al obtener su valor Q se tiene una buena indicación de la tendencia a producir péptidos amargos mediante su hidrólisis. Las proteínas que tienen una mayor predisposición a producir péptidos amargos, son las que tienen un alto valor Q (Ney, 1979). Entre estas proteínas se encuentra caseína ($Q=1605$ cal/mol), proteína de soya ($Q=1540$ cal/mol) y zeína, la proteína del maíz ($Q=1480$ cal/mol), mientras que proteínas cárnicas y colágeno (1300 y 1280 cal/mol respectivamente) pueden no producir péptidos amargos durante su hidrólisis (Adler-Nissen, 1986).

La hidrólisis de proteína de pescado no presenta serios problemas con la formación de péptidos de sabor amargos ($Q=1125$ cal/mol); quizá esto sea una de las razones importantes del interés en la producción de hidrolizados de

proteína de pescado para su aplicación en alimentos (Adler-Nissen, 1976; 1986).

La presencia o ausencia de sabor amargo es un criterio esencial para aceptar o rechazar la utilización de un hidrolizado de proteína. Varios métodos para eliminar el sabor amargo de los hidrolizados han sido desarrollados, los cuales se clasifican en cuatro grupos principales:

Separación selectiva de péptidos amargos. Para su remoción, el hidrolizado es filtrado sobre carbón activado (absorbentes hidrofóbicos) (Adler-Nissen, 1986; Eriksen y Fagerson, 1976), u otros absorbentes como resina de formaldehído fenólico, mezclas azeotrópicas de butanol y agua. Este método es eficiente en remover el sabor amargo, pero resulta en una pérdida de nitrógeno y aminoácidos esenciales (Adler-Nissen, 1986).

Eliminación de sabor amargo mediante la reacción de plasteínas. Este efecto fue descubierto y estudiado primeramente por los investigadores japoneses Fujimaki *et al.*, (1970) y Yamashita *et al.*, (1970). La reacción de plasteína implica la formación de una sustancia proteínica tipo gel a partir de un concentrado de hidrolizado de proteína (20-50%), el cual ha sido incubado con proteasas bajo condiciones apropiadas. La plasteína usualmente es recuperada por precipitación con etanol y acetona. El rendimiento de la plasteína es dependiente del tipo de sustrato y enzima, concentración de sustrato y pH. La plasteína se forma como un resultado de la transpeptidación; parece ser inducida por interacciones hidrofóbicas. Lo anterior trae como consecuencia la eliminación del sabor amargo, debido a que el efecto de las cadenas laterales hidrofóbicas se encuentran cancelado por la formación de polipéptidos de mayor

peso molecular, reduciendo la capacidad de interacción de estas cadenas laterales con las glándulas receptoras del sabor.

La reacción de la plasteína se aplicó inicialmente para eliminar el sabor amargo en hidrolizados; sin embargo se ha encontrado que también es eficiente para la incorporación de ésteres de aminoácidos a través de la reacción de transpeptidación, permitiendo introducir aminoácidos esenciales en la cadena peptídica. De esta manera, se han obtenido productos de proteína nutricionalmente balanceados (Yamashita *et al.*, 1970; Hartnett y Saterlee, 1989; Eriksen y Fagerson, 1976; Adler-Nissen, 1986).

Enmascarado del sabor amargo. Compuestos como glicina libre, ácido málico y otros ácidos orgánicos, han sido utilizados para enmascarar el sabor amargo de hidrolizados. La presencia de polifosfatos durante la hidrólisis de caseína ha reducido el sabor amargo; el mismo efecto ha sido obtenido cuando se encuentran presente hidrocoloideos como goma guar, pectina y maltodextrina (Adler-Nissen, 1986).

Aplicación de exopeptidasas para eliminar sabor amargo. Debido a que los aminoácidos libres son menos amargos que los péptidos y de que el sabor amargo es más intenso cuando los aminoácidos hidrofóbicos no son terminales, se ha sugerido el uso de exopeptidasas para eliminar el sabor amargo de los hidrolizados. Una desventaja de utilizar este método, se debe a que los hidrolizados puedan llegar a tener grados de hidrólisis muy altos consistiendo principalmente de aminoácidos libres y pequeños péptidos (Fujimaki *et al.*, 1970; Eriksen y Fagerson, 1976; Adler-Nissen, 1986),

presentando a la vez una alta osmolaridad lo que pudiera causar problemas de diarrea (Adler-Nissen, 1986).

Aspectos de Salud Relacionados al Uso de Hidrolizados en la Nutrición Humana

Los ingredientes para ser utilizados en alimentos deben cumplir la condición de ser GRAS (acrónimo inglés para Generally Recognised As Safe) o "Generalmente Reconocidos como Seguros".

Actualmente, una gran cantidad de enzimas proteolíticas utilizadas en la elaboración de hidrolizados son reconocidas como ingredientes GRAS, tal es el caso de Alcalasa, proteinasa grado alimenticio producida por Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, Denmark) a partir de *Bacillus licheniformis* (Adler-Nissen, 1986).

La producción y uso de hidrolizados enzimáticos de caseína, proteína animal, soya, suero y albúmina de huevo, están aprobados por la FDA (1984) en la formulación de alimentos, siempre que se sigan "buenas prácticas de manufactura". Lo anterior implica altas medidas sanitarias con un estricto control en la calidad química y microbiológica (Adler-Nissen, 1986).

Desarrollo de Nuevos Productos

Los procesadores de alimentos reconocen que el cambiar los hábitos de consumo de la población es un proceso lento y resistivo, por lo que para introducir un nuevo producto al mercado con gran éxito es necesario que el consumidor se encuentre familiarizado con este, por lo que es necesario para un buen éxito una emulación de los mismos.

Los hábitos de consumo de productos de origen marino en la población, generalmente son bajos y se encuentran estrechamente relacionados a la disponibilidad y a las características sensoriales que presentan estos productos, como son espinas o huesos intramusculares, olor y sabor intenso, tamaño pequeño, etc. Esto último induce a que muchas personas no desean saber nada respecto a los productos marinos.

Mediante un cambio de la presentación tradicional de especies marinas de bajo valor, se ha logrado su industrialización. El deshuesado mecánico y el desarrollo de la tecnología del surimi, ha sido un gran apoyo para lograr estos objetivos. Productos a base de surimi, como análogos de mariscos (camarón, jaiba, callos, etc.), han logrado una alta aceptación por el público, principalmente en EUA y Canadá. Esto ha ocasionado un aumento en el consumo de proteína de origen marino, ya que estos productos presentan características sensoriales y nutritivas semejantes a los naturales, con un precio mas bajo que el producto original.

Otro producto desarrollado es el marinbeef, el cual es un producto seco que presenta una alta capacidad de absorción de agua (alrededor de 3 partes de agua por 1 de producto) y atractivo para la elaboración de hamburguesas y albóndigas, no obstante, este aún no ha logrado una gran aceptación como el surimi.

El utilizar proteínas de origen marino en alimentos para consumo humano es de gran importancia ya que aportan un alto valor nutricional y pueden desarrollar propiedades funcionales requeridas en el producto presentando características sensoriales atractivas.

El desarrollo de nuevos productos implica el estudio de propiedades funcionales de los nuevos ingredientes que se desean aplicar en la elaboración del mismo. El reemplazar parcial o totalmente un ingrediente tradicional va a depender de las características que presente este nuevo ingrediente.

A diferencia de otros segmentos de la industria alimentaria, la industria pesquera ha realizado pocos esfuerzos para diversificar sus líneas de producción. Esta se ha dirigido únicamente a procesar productos pesqueros tradicionales en muy pocas presentaciones como el enlatado, secado-salado, congelado y ahumado; sin embargo, otras especies pudieran ser aprovechadas para consumo humano mediante la aplicación de estas tecnologías o mediante el desarrollo de nuevos productos.

El aprovechar estas especies para consumo humano mediante la elaboración de ingredientes funcionales y su aplicación en nuevos productos,

es una buena alternativa de aumentar el consumo de proteína animal y de esta forma diversificar la industria procesadora de alimentos marinos.

Los hidrolizados de proteína de pescado con características funcionales podrían ser utilizados para diseñar y elaborar productos como cremas, aderezos, golosinas, botanas, yoghurt, bebidas nutritivas, nieves, croquetas, productos de humedad intermedia, embutidos, etc., los cuales actualmente tienen una gran aceptación por el público.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la Materia Prima

Se utilizó Merluza del Pacífico (*Merluccius productus*), obtenida en muestreos de 40 y 100 kg, realizados durante los meses de marzo y mayo de 1994 respectivamente. Las muestras se obtuvieron al momento del desembarque de lanchas pesqueras en el campo pesquero el Desemboque del Seri, Sonora. El pescado fue perfectamente enhielado en capas alternadas de hielo-pescado y transportado a los laboratorios del CIAD, donde se procedió a medir peso y longitud de cada espécimen.

Obtención de la Carne Molida

Al pescado se le eliminó manualmente vísceras, cabeza y la porción del espinazo por encima de la cavidad visceral. Posteriormente, fue sometido en forma de mariposa a un deshuesador mecánico Bibun Modelo NDX103 (Bibun Corp. Fekuyama, Japón), para obtener el músculo molido, haciendo los ajustes necesarios en el equipo para obtener el máximo rendimiento. Se calculó rendimiento por muestreo de músculo molido obtenido respecto al peso inicial del pescado.

Se empaquetaron porciones de un kg de músculo molido en bolsas de plástico y se almacenaron en congelación a -20°C hasta su utilización.

Análisis Químico

El análisis proximal, humedad (950.46), proteína (981.10), lípidos (960.39) y cenizas (938.08) del músculo molido y de los hidrolizados producidos, se realizó de acuerdo a la metodología de la AOAC (1990).

Los extractos de nitrógeno no proteico (NNP) del músculo molido se obtuvieron de acuerdo a la técnica de Woyewoda *et al.*, (1986); su contenido de nitrógeno (928.08) se analizó por la técnica del microKjeldahl recomendado por la AOAC (1990).

Actividad Proteolítica Endógena

Se homogenizaron 30 g de músculo molido con 120 mL de buffer frío (relación 1:4, músculo:buffer) durante 30 seg a máxima velocidad, utilizando una licuadora Osterizer Modelo 65-43M (Sunbean Mexicana S.A de C.V. México, D.F) con vaso de 200 mL. La temperatura durante su preparación no excedió los 10 °C. Los bufferes utilizados para la homogenización fueron de citrato 0.05 M para pH 3.0, 3.5 y 4.0; de fosfato 0.1 M para pH 7.0, 7.5 y 8.0 y solución de NaCl 0.1 M para el pH normal del músculo. Las temperaturas de incubación fueron 30, 35, 40 y 50 °C, para las condiciones ácidas; 50 y 60 °C, para las condiciones neutras y alcalinas y de 60°C para el pH normal.

Se colocaron, por triplicado, 5 mL del homogenado en tubos de ensaye (18X150 mm) y se incubaron durante una hora a las diferentes temperaturas. Un blanco control se mantuvo en hielo por el mismo período. La reacción se

finalizó mediante la adición de 5 mL de una solución fría (0-5 °C) de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Después de 30 min de reposo sobre hielo, se filtró utilizando papel Whatman No. 1. Al filtrado se le determinó el contenido de proteína (productos de hidrólisis) por el método Lowry *et al.*, (1951), utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Modelo Lambda 3B UV/VIS (Perkin Elmer de México, S.A de C.V; México, D.F) a 500 nm. Se utilizó una curva estándar de tirosina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), a partir de una solución 200 µg/mL . Los resultados fueron convertidos a µg de tirosina (Tir) liberada/g de proteína/hora de incubación.

Determinación del Grado de Hidrólisis (GH)

Se llevó a cabo de acuerdo a la técnica del ácido trinitrobencilsulfónico (TNBS) descrito por Adler-Nissen (1979), con las siguientes modificaciones. A una alícuota de 1 mL de hidrolizado, por duplicado, se le agregaron 10 mL de SDS al 10%; la mezcla se calentó a 80°C por 30 minutos, para posteriormente aforarse con agua destilada a 100 mL dando una concentración final de 1% de SDS. De esta solución, se utilizaron 0.25 mL, por triplicado, para la cuantificación de grupos aminos libres mediante la reacción con TNBS. Se utilizó L-leucina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) como estándar a concentraciones de 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.13 y 0.06 µM/mL. Al compuesto resultante se le midió absorbancia a 340 nm utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Modelo Lambda 3B UV/VIS.

Los datos fueron transformados a meq α -amino/g de proteína ó equivalente de hidrólisis (h). Para el cálculo del GH se consideró un equivalente de hidrólisis total (h_{tot}) de 8.6 meq α -amino/g de proteína, como lo recomienda Adler-Nissen (1986) para concentrado de proteína de pescado, donde $\%GH = h/h_{tot}(100)$.

Cálculo del pK

La calibración del pH stat implica la determinación del pK promedio de los hidrolizados de proteína obtenidos, debido a que el pK promedio de los grupos α -amino no es una constante, sino que varía con la naturaleza del aminoácido terminal del cual forma parte, de la longitud de la cadena del péptido y de la temperatura.

El cálculo del pK promedio de los productos de hidrólisis de la proteína de pescado se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Adler-Nissen (1986). Se preparó un homogenado a 8% de proteína, como se menciona en la sección correspondiente. El homogenado se colocó en baño maría hasta alcanzar 50°C, y se ajustó a los pH requeridos, que en este caso fueron de 8.0, 8.5 y 9.0. Posteriormente al ajuste del pH, se adicionó la preparación enzimática Alcalasa 0.6L (Novo Industries A/S. Copenhagen, Denmark) a una concentración de 2% (E/S). Durante la hidrólisis, el pH se mantuvo constante utilizando un autotitulado Metler DL25 (Mettler Instrument Co. Hightstown, NJ). El incremento en el consumo de base y el incremento en grupos aminos libres, fue determinado durante la hidrólisis a los 5, 10, 15, 30,

45, 60, 90 y 120 min. Los datos del consumo de meq de NaOH/g de proteína a los diferentes tiempos, fueron correlacionados con los meq de grupos α -amino libres/g de proteína y de acuerdo a las pendientes obtenidas a los diferentes pH, se calculó el pK promedio de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$pK = pH_2 + \log(m_1 - m_2) - \log(10^{pH_2 - pH_1} \times m_2 - m_1)$$

donde: $pH_2 > pH_1$ y m_1 y m_2 son las pendientes a los pH_1 y pH_2 respectivamente.

Producción de Hidrolizados

Para la producción de los hidrolizados se seleccionó la condición donde se detectó la mayor actividad proteolítica muscular endógena (pH 7.0 a 60°C).

La elaboración del hidrolizado con actividad endógena se realizó de la siguiente manera: Se preparó un homogenado al 8% de proteína utilizando agua destilada fría y músculo molido utilizando una licuadora Osterizer Modelo 65-43M, durante 2 minutos a máxima velocidad. La temperatura durante la preparación del homogenado no excedió los 10°C.

Se colocó un kg de homogenado en un vaso de precipitado de 2 L, y se calentó con agitación en baño maría hasta alcanzar la temperatura de 60°C. En este punto, se ajustó su pH a 7.0 con una solución 1N de NaOH, utilizando un autotitulado Mettler DL25. El homogenado se mantuvo a pH 7.0 durante una hora, para posteriormente incrementar el pH a 8.5 mantenido por el tiempo requerido para lograr un consumo de base total de 0.34 meq NaOH/g de

proteína, correspondiente a un GH de 4.43% determinado por el método del TNBS. Este valor corresponde al NaOH requerido para el ajuste y mantenimiento a pH 7.0 y titulación a pH 8.5. Durante todo el período de la reacción hidrolítica, el homogenado se mantuvo con agitación utilizando un agitador de aspas (Everbach Corporation. Ann Arbor, MI).

Para la producción de hidrolizados con enzima comercial, se utilizó Alcalasa 0.6 L (Novo Industries A/S. Copenhagen, Denmark), una preparación grado alimenticio obtenida a partir de *Bacillus licheniformis*. Las condiciones utilizadas fueron de pH 8.0, 50°C y 8% de proteína muscular (Sustrato). La concentración de la preparación de enzima utilizada fue de 1.0, 1.5 y 3.0% enzima/sustrato (E/S), para obtener grados de hidrólisis del 10, 15 y 20% respectivamente, en un tiempo establecido no mayor de 2 horas. El grado de hidrólisis fue controlado mediante la técnica del pH stat descrito por Adler-Nissen (1986), adicionando NaOH 1 N con un autotitulado Mettler DL25. El pK promedio utilizado para determinar el GH por el método del pH stat fue de 7.61. Este valor fue determinado como se mencionó anteriormente.

El proceso hidrolítico fue detenido mediante calentamiento de la mezcla de reacción a 80°C por 10 min. Posteriormente, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 9,500 xg durante 30 min a 20°C, en una centrifuga refrigerada Beckman Modelo J2-21 (Beckman Instruments Inc. Palo Alto, CA). La fracción soluble, cuyo volumen varió dependiendo del grado de hidrólisis, se transfirió cuantitativamente a frascos de liofilizador de 1.2 L y se congeló a -40 °C por 24 horas, para ser liofilizadas en un liofilizador Labconco Modelo 77530 (Labconco Corporation. Kansas City, MO), por aproximadamente 72 horas a una presión de vacío menor de 80×10^{-3} mBar y -50°C. El producto

seco se empacó al vacío en bolsas de plástico y se mantuvo en congelación a -20°C hasta su posterior utilización. Todos los hidrolizados fueron elaborados por triplicado.

Propiedades Funcionales de los Hidrolizados

En base a estudios preliminares de las técnicas de Índice de actividad emulsificante (IAE) e Índice de estabilidad emulsificante (IEE), se utilizó una solución al 0.1% de proteína a partir del hidrolizado liofilizado, mientras que para la capacidad emulsificante (CE), Capacidad Espumante (CEsp) y estabilidad de la espuma (EEsp), la solución fue al 0.3% de proteína. Las soluciones de proteína se prepararon de acuerdo a la técnica descrita por Quaglia y Orban (1987) con algunas modificaciones. El hidrolizado liofilizado se disolvió en agua destilada durante 10 min utilizando un agitador magnético; posteriormente, su pH se ajustó a 4.0, 7.0 y 10.0 utilizando NaOH ó HCl 0.1 N. Todas las propiedades de funcionalidad fueron determinadas por triplicado a los pH anteriormente señalados.

Solubilidad en Agua

La determinación de solubilidad de los hidrolizados se llevó a cabo de acuerdo a Chobert *et al.*, (1988), con ciertas modificaciones. Se disolvieron 0.5 g de hidrolizado en 20 mL de agua destilada durante 10 min, utilizando un agitador magnético. Después de este tiempo, se ajustó el pH a 4.0, 7.0 y 10.0

utilizando NaOH ó HCl 0.1 N. Se determinó por microKjeldahl (AOAC, 1984) el contenido de proteína de la mezcla para posteriormente ser centrifugada a 4000xg durante 30 minutos a 20°C utilizando un centrifuga Beckman Modelo J2-21. El contenido de proteína en el sobrenadante se determinó por microkjeldahl (AOAC, 1990) y se reportó como % de solubilidad.

Capacidad Emulsificante (CE)

La CE se determinó de acuerdo a la metodología de *Webbet al.*, (1970), modificada. Se homogenizó una alcuota de 50 mL de la solución de proteína al 0.3% en una licuadora Osterizer Modelo 65-43M a máxima velocidad, al tiempo que se le adicionaba aceite comestible de maíz Mazola (Productos de Maiz, S.A de C.V. México, D.F.) a un flujo constante de 1.1 mL/seg mediante el uso de un embudo de separación de 500 mL. La adición de aceite se detuvo al observar de manera directa el cambio en el tipo de emulsión, de aceite en agua a agua en aceite. El gasto de aceite se cuantificó por diferencia en peso y la capacidad emulsificante reportada como g de aceite emulsificado/50 mL de solución al 0.3% de proteína.

Índice de Actividad Emulsificante (IAE)

El IAE se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Pearce y Kinsella (1978), con algunas modificaciones. En un tubo de 50 mL de polialómero (Nalge Company, Rochester, NY), se homogenizaron 9 mL de una solución al 0.1% de proteína con 3 mL de aceite de maíz Mazola utilizando un

homogenizador de tejido Tissumizer Tekmar (Tekmar Co. W. Germany) durante 30 segundos a velocidad 50, regulado por un ajustador de corriente modelo TR-10 (Tekmar Co. Cincinnati, OH). Después de un minuto de formada la emulsión, se tomó del fondo del tubo 50 μ L y se diluyeron a 10 mL con SDS al 0.1% (dilución 1:200). El tubo se agitó y se le determinó la absorbancia a la solución a 500 nm utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer Modelo Lambda 3B UV/VIS. El índice de actividad emulsificante (IAE) fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{IAE (m}^2/\text{g)} = 2.303(2)(\text{Dilución})A_{500\text{nm}}/0.001(\phi)(10,000)$$

donde:

A = Absorbancia; Dilución=200;

ϕ = fracción del volumen de la fase dispersa = 0.25

Índice de Estabilidad de la Emulsión (IEE)

El IEE se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Pearce y Kinsella (1978), con algunas modificaciones. Tres minutos después de preparada la emulsión para el IAE, se tomaron 5 mL del fondo del tubo y se transfirieron a un tubo limpio y seco. Después de 24 horas de reposo a temperatura ambiente, se procedió a preparar la dilución 1:200 con SDS al 0.1% y medir su absorbancia a 500 nm. Se reportó la diferencia entre el IAE a las 0 y 24 horas como porcentaje de IEE de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{IEE} = 100 - [(\text{IAE}_{(t=0)} - \text{IAE}_{(t=24\text{h})}) / \text{IAE}_{(t=0)}](100)$$

Capacidad espumante (CEsp)

La CEsp de los hidrolizados se determinó por el método de aereación propuesto por Waniska y Kinsella (1979), con algunas modificaciones. Se utilizó una columna de vidrio para cromatografía de baja presión de 1 cm de diámetro interno y 30 cm de longitud con filtro fijo en el fondo (BioRad Laboratories, Richmond, CA), acoplada a un autituladores Mettler DL25 para asperjar 10 mL de aire a un flujo constante de 40 mL/min. Para el análisis se utilizaron 5 mL de solución de proteína al 0.3%, tomando como proteína de comparación albúmina de bovino (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO). La capacidad espumante se calculó dividiendo el volumen de la espuma formada entre el volumen del líquido que se requirió para formar la espuma. La capacidad espumante se reporta como mL de espuma formada/mL de solución de proteína al 0.3%.

Estabilidad de la espuma (EEsp)

La EEsp se evaluó por el método del "líquido drenado", siguiendo la metodología de Waniska y Kinsella (1979), con algunas modificaciones. Para la evaluación, se utilizó la espuma que se formó en la determinación de capacidad espumante. El volumen de líquido que se encontraba formando la espuma después de un minuto se consideró como 100%; la cantidad del líquido drenado se monitoreó por 5 minutos. Los datos generados se graficaron como % de líquido retenido con respecto al tiempo.

Análisis Estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorio con arreglo factorial 4X3. Los efectos principales fueron: grado de hidrólisis (GH) con cuatro niveles y pH con tres niveles. Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza y comparación de medias por el método de Duncan, cuando la interacción de los efectos principales no fue significativa. Para todos los casos el nivel de significancia fue del 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó en dos etapas experimentales. En la primera etapa se determinó la condición de pH y temperatura donde se presenta la mayor actividad de enzimas proteolíticas en el músculo de merluza del Pacífico. En la segunda, se elaboraron los hidrolizados utilizando condiciones diferentes durante su producción. Primeramente se aprovechó la actividad enzimática presente en el músculo, para posteriormente evaluar la adición de la preparación enzimática comercial Alcalasa 0.6 L. Se caracterizó funcionalmente a los hidrolizados obtenidos y las propiedades emulsificantes y espumantes comparadas con el caseinato de sodio y albúmina bovina respectivamente, los cuales son ingredientes de uso común en la industria alimentaria.

Características de la Materia Prima

El peso promedio de la merluza utilizada fue de $1,167 \pm 608$ g, con pesos en el rango de 550 g a 1700 g; la talla promedio fue de 49 ± 9 cm. De acuerdo al rango de tallas que presentó la muestra (40-56 cm), la edad de los especímenes se ubica entre los 6 y 7 años de acuerdo a la clasificación de Inada (1981) para merluza.

La fracción comestible varía entre las especies oscilando del 30 a 60%; depende de la forma, edad y si esta fue capturada antes o después del desove

(Suzuki, 1980). La recuperación de esta fracción depende de la técnica utilizada para realizar la operación. Mazorra y Ramírez (1991), reportan un rendimiento del 40% para sardina monterrey mediante fileteado manual; sin embargo, la utilización de la tecnología del deshuesado mecánico ha facilitado y eficientado esta operación, lográndose obtener de un 15 a 30% adicional, comparado con la operación manual (Bykowski, 1990).

En el presente estudio, el rendimiento promedio de la fracción comestible obtenida mediante deshuesado mecánico fue 45 ± 0.7 % respecto al peso total del pescado; este valor es alto si se compara con el 32-35% reportado para la misma especie por Crawford *et al.*, (1979), Chang-Lee (1988) y Pacheco-Aguilar *et al.*, (1989). El alto rendimiento obtenido pudo deberse a las diferencias de talla entre las muestras utilizadas, ya que los investigadores anteriormente señalados utilizaron especímenes de aproximadamente 30 cm de longitud las cuales son de menor edad (Inada, 1981; Suzuki, 1980).

Otro factor que pudo haber influido en el alto rendimiento obtenido, es que a la merluza antes de ser sometida al deshuesado mecánico se le removió manualmente la parte superior del espinazo que esta localizada sobre la porción estomacal. Por ser hueso de tamaño grande, de forma triangular y resistente, el no eliminarlo provocaría una reducción en rendimiento al no poderse recuperar la fracción adherida al mismo. Debe considerarse igualmente, las posibles diferencias en el ajuste de la tensión de la banda del deshuesador mecánico utilizado, ya que esto tiene un gran impacto en el rendimiento obtenido. Mayor tensión en la banda resulta en un mayor rendimiento (Bykowski, 1990).

Composición Proximal

El contenido de humedad, proteína y cenizas en el músculo molido de merluza del Pacífico, no mostró una variación apreciable entre los muestreos, obteniéndose valores de $82.6 \pm 1.0\%$, $16.1 \pm 0.9\%$ y $1.1 \pm 0.05\%$ respectivamente. Pacheco-Aguilar (1990), reportó valores similares para la misma especie.

La merluza del Pacífico se caracteriza por ser una especie magra, para la cual la literatura reporta valores menores al 1.5% de lípidos (Pacheco-Aguilar *et al.*, 1989; Perkins, 1992). En el presente estudio se obtuvo un promedio de $0.3 \pm 0.1\%$ lo cual concuerda con lo reportado en la literatura. Un alto contenido de lípidos presentaría una desventaja durante la elaboración de hidrolizados ya que podría significar la adición de una posible etapa de desgrasado durante o posterior a su elaboración o una reducción en la eficiencia hidrolítica debido a interacciones proteína-lípido.

El contenido de NNP ($0.3 \pm 0.03\%$) fue bajo al compararse con los valores de 0.4-0.8% reportados para la misma especie por Simidu (1961). La literatura reporta que esta especie se caracteriza por presentar una alta actividad proteolítica muscular, aumentando rápidamente su contenido de NNP si no se maneja y procesa en forma adecuada (Erickson *et al.*, 1983; Tsuyuki *et al.*, 1982). Del bajo valor de NNP obtenido en este estudio, se concluye que la materia prima utilizada se maneja en condiciones óptimas (tiempos y temperaturas), retardando con ello la actividad enzimática que se traduciría en aumento del NNP.

La composición proximal de la fracción soluble de los hidrolizados liofilizados se muestran en el Cuadro 3. Se obtuvieron valores promedio de $3.3 \pm 0.4\%$ para humedad, $87.1 \pm 1.6\%$ para proteína, 0.22 ± 0.1 para lípidos y $13.0 \pm 2.4\%$ para cenizas. Se observa un mayor contenido de cenizas en el hidrolizado con un GH del 5%, debido al NaOH adicionado en su preparación. En general, estos hidrolizados presentan un contenido de proteína por encima del 85% y un bajo contenido en lípidos. Esto último hace innecesaria su remoción, por lo que los problemas de oxidación de lípidos durante su almacenamiento serían mínimos.

Cuadro 3. Composición proximal (%) de los hidrolizados producidos.

	GH5%	GH10%	GH15%	GH20%
Humedad	2.6 ± 0.6^a	3.6 ± 1.9^a	3.2 ± 0.1^a	2.8 ± 0.8^a
Proteína	85.6 ± 2.3^a	88.6 ± 0.3^b	88.4 ± 0.3^b	85.6 ± 0.3^a
Lípidos	0.3 ± 0.1^a	0.1 ± 0.1^a	0.2 ± 0.2^a	0.3 ± 0.1^a
Cenizas	16.6 ± 0.3^a	11.9 ± 0.0^b	11.7 ± 0.4^b	11.9 ± 0.4^b

* Cifras en renglones con el mismo superíndice son iguales ($p > 0.05$)

Actividad Proteolítica en Músculo de Merluza del Pacífico

La actividad proteolítica en músculo de merluza se determinó bajo las condiciones de pH y temperatura descritas en el Cuadro 4. Estas condiciones fueron seleccionadas en base a información bibliográfica, la cual señala condiciones donde se detectó una mayor actividad proteolítica utilizando

extractos enzimáticos de diferentes músculos de pescados, así como diferentes sustratos (Koury *et al.*, 1971; Kono y Fukazawa, 1993; Jiang *et al.*, 1990; Erickson *et al.*, 1983; Deng, 1981; Tsuyuki *et al.*, 1982).

Cuadro 4. Condiciones de pH y temperatura evaluadas para determinar las zonas de máxima actividad proteolítica en músculo de merluza del Pacífico.

pH/T	30°C	35°C	40°C	50°C	60°C
3.0	**	**	**	**	**
3.5	**	**	**	**	**
4.0	**	**	**	**	**
6.75 ¹					**
7.0				**	**
7.5				**	**
8.0				**	**

¹pH normal del músculo

La Figura 3 muestra el promedio de la actividad proteolítica obtenida para los dos muestreos. Se detectaron zonas de máxima actividad a pH 3.5-4.0 (50°C) y pH 6.75-7.0 (60°C), con valores aproximados a 10×10^3 y 8×10^3 μg Tir/g proteína/hora, respectivamente. Los resultados indican actividad de enzimas ácidas y alcalinas en el músculo de las muestras de merluza a temperaturas comunes en el procesado térmico de alimentos. Se observó que la fracción enzimática activa a pH 3.0 es inhibida a temperaturas mayores de 40°C, mientras que temperaturas superiores a 50°C inhiben la actividad detectada a pH 3.5 y 4.0. Este comportamiento, concuerda con lo

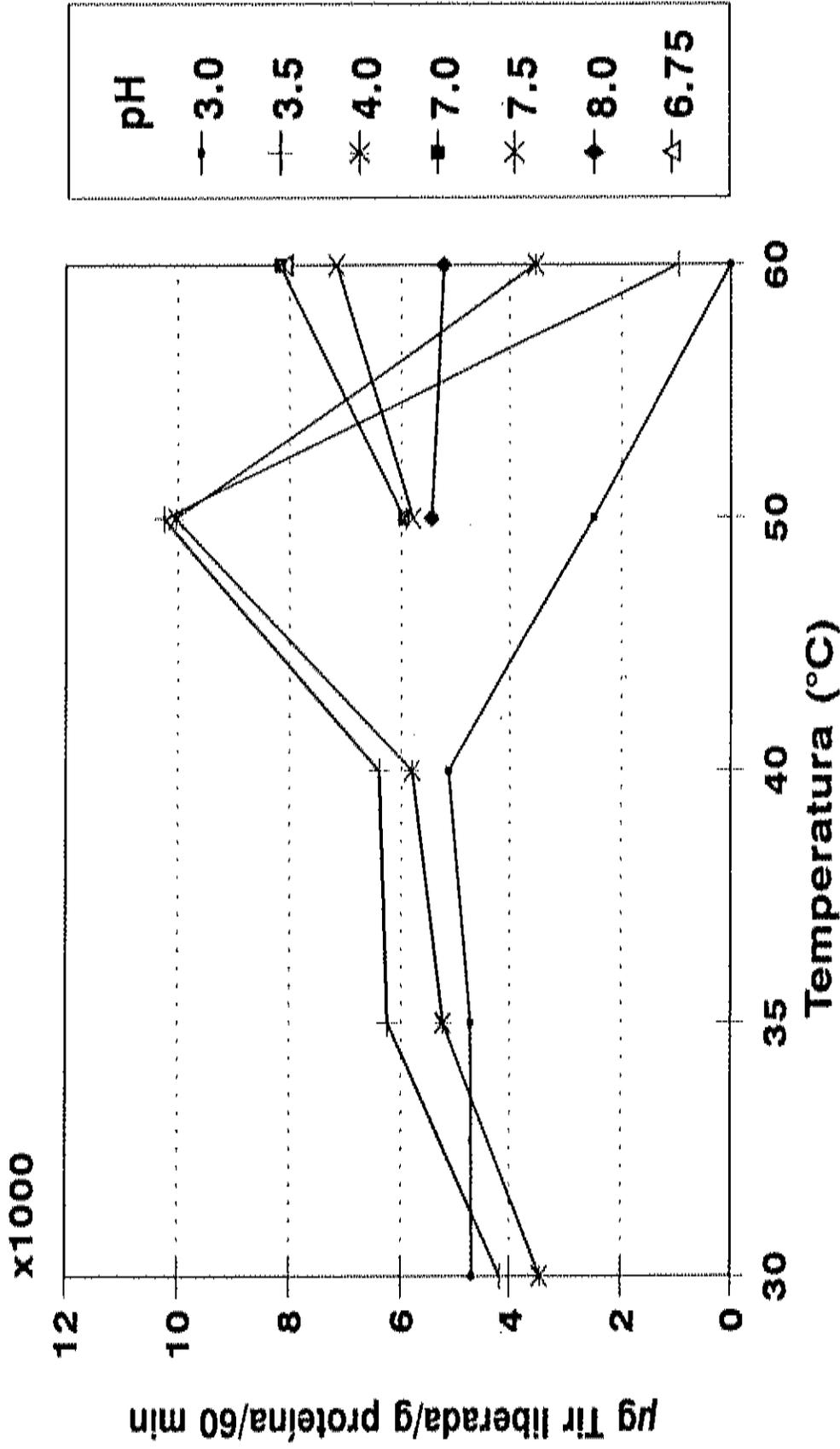
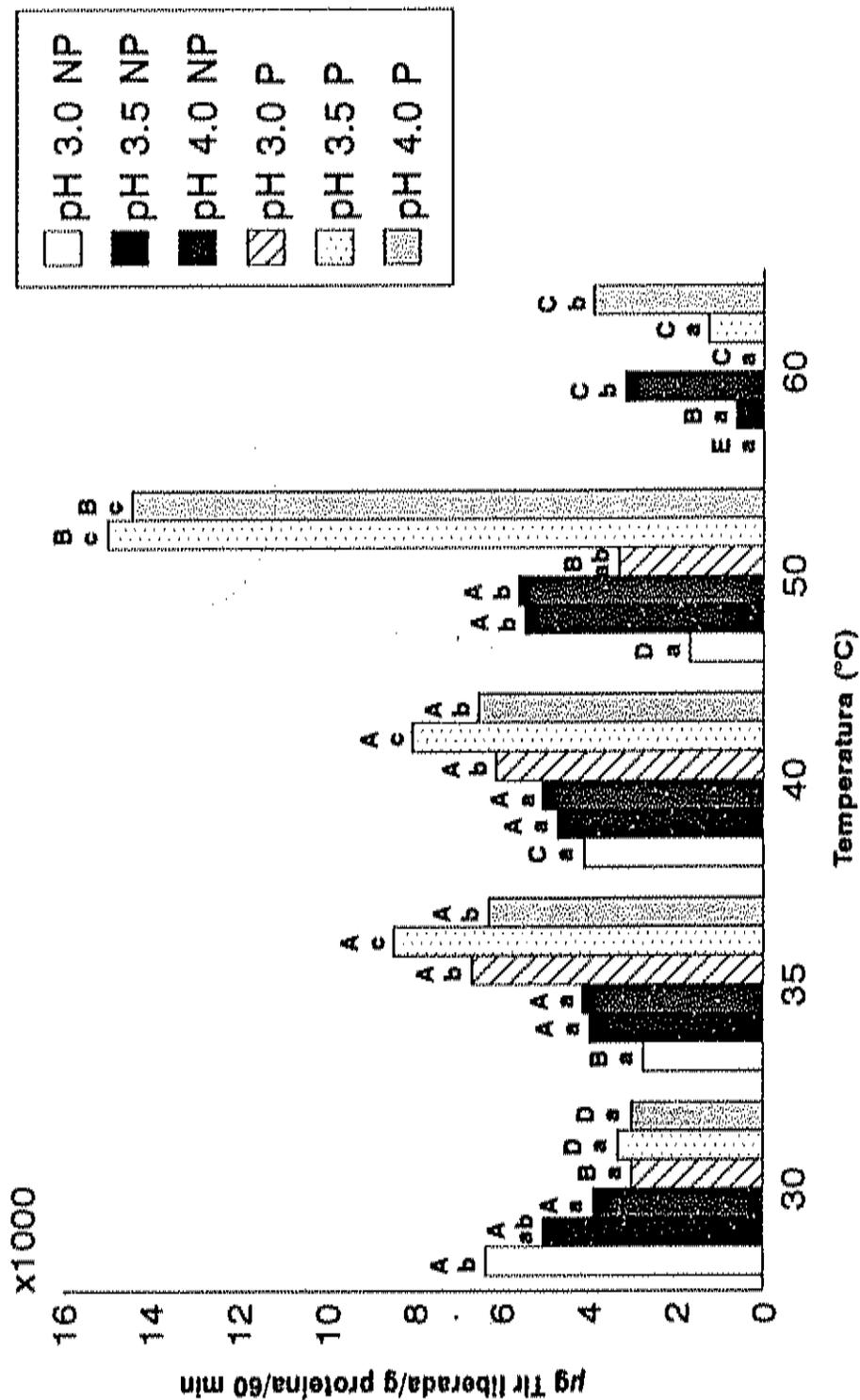


Figura 3. Actividad proteolítica promedio ($n=2$) en músculo de merluza del Pacífico (*M. productus*) a varios pH's y temperaturas.

reportado por Koury *et al.*, (1971), donde señala que la actividad enzimática muscular de merluza generalmente es mayor a pH ácido, la cual tiende a disminuir cuando la temperatura excede los 50°C. Por otro lado, se observó que la actividad detectada a pH neutro y alcalino se incrementó a temperaturas superiores a ésta última.

Se observaron diferencias apreciables en las manifestaciones del grado de parasitación muscular entre los especímenes de los dos muestreos. En el primero de ellos, las manifestaciones fueron mínimas, no obstante no se descartó su presencia; en el segundo, se observó la manifestación de una parasitación avanzada (Tsuyuki *et al.*, 1982; Patashnik *et al.*, 1982). Para evaluar el efecto en la actividad enzimática en el músculo, en función del "grado aparente" de parasitación, los datos de la Figura 3 se analizaron separadamente por muestreo. La Figura 4 muestra el efecto del grado aparente de parasitación en la actividad enzimática en el músculo a diferentes pH y temperaturas. Se observó una clara diferencia en el comportamiento entre los dos muestreos. Se detectó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los muestreos en la actividad enzimática a 35°C y 40°C, siendo mayor en ambos casos para el músculo con mayor grado aparente de parasitación. Para cada una de estas temperaturas, no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) por muestreo entre los pH evaluados (3.0, 3.5 y 4.0). En ambos muestreos, la actividad enzimática detectada a pH 3 disminuyó significativamente ($p < 0.05$) a temperaturas superiores a los 40°C.

Los resultados indican que la actividad enzimática detectada a pH 3.5 y 4.0 no mostró un aumento significativo ($p > 0.05$) al aumentar la temperatura de incubación de 40°C a 50°C en el músculo con menor grado de



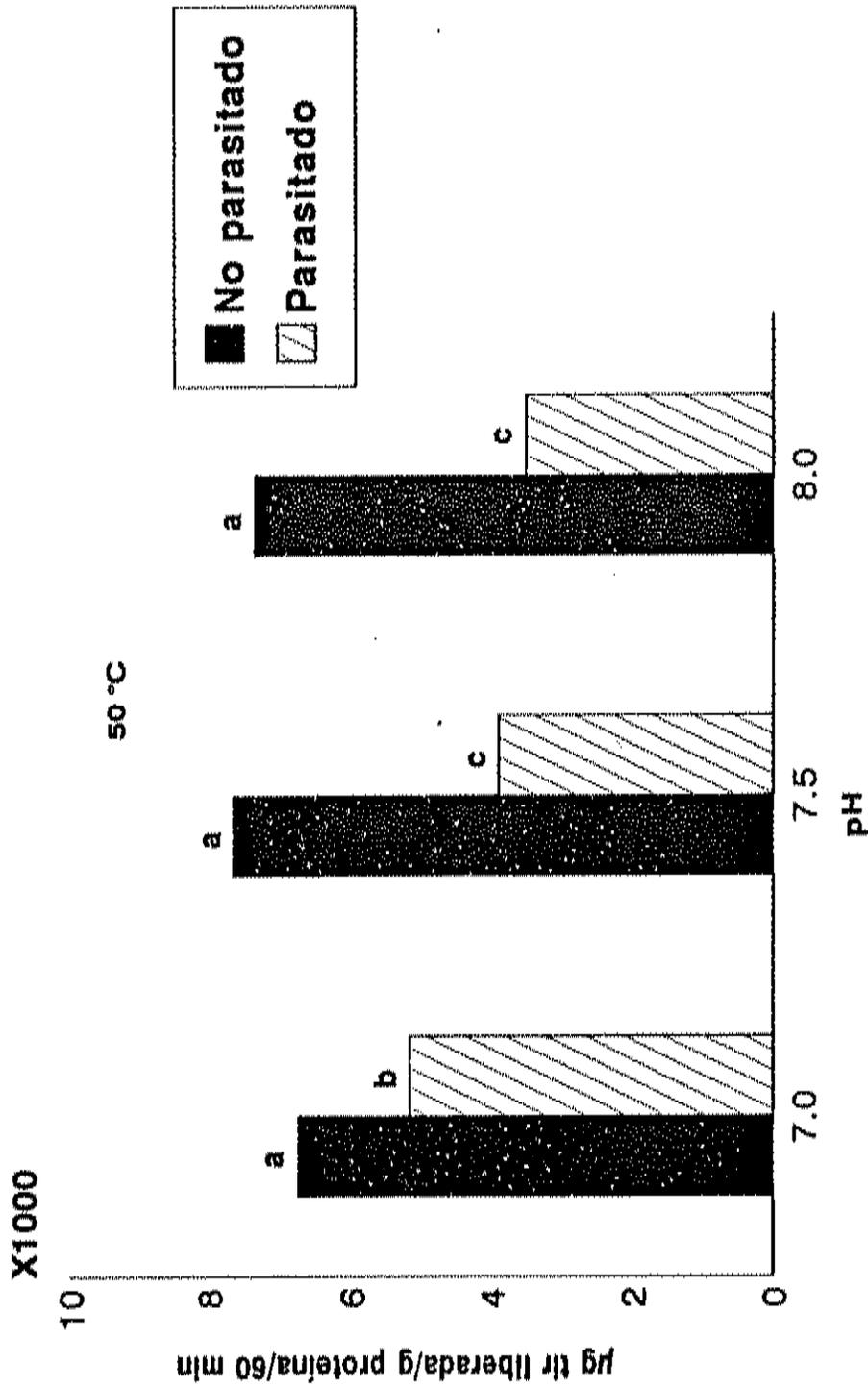
*Letras minúsculas diferentes dentro de una misma temperatura indican diferencia significativa ($p < 0.05$).
 Letras mayúsculas diferentes para cada valor de pH indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Figura 4. Efecto del tipo de muestra de merluza del Pacífico (*M. productus*) sobre la actividad proteolítica a pH ácido y diferentes temperaturas.

parasitación, no obstante para el músculo con mayor grado, el aumento fue altamente significativo ($p < 0.001$). Esta fue la diferencia más apreciable detectada a pH ácidos entre los dos muestreos, definida, como los resultados sugieren, por el grado aparente de parasitación. La magnitud de la actividad enzimática en el músculo con menor parasitación (primer muestreo) fue de aproximadamente el 30% de la observada para el músculo con mayor parasitación (segundo muestreo). Temperaturas superiores a 50 °C inhibieron toda actividad enzimática detectada en el rango de pH ácido evaluado.

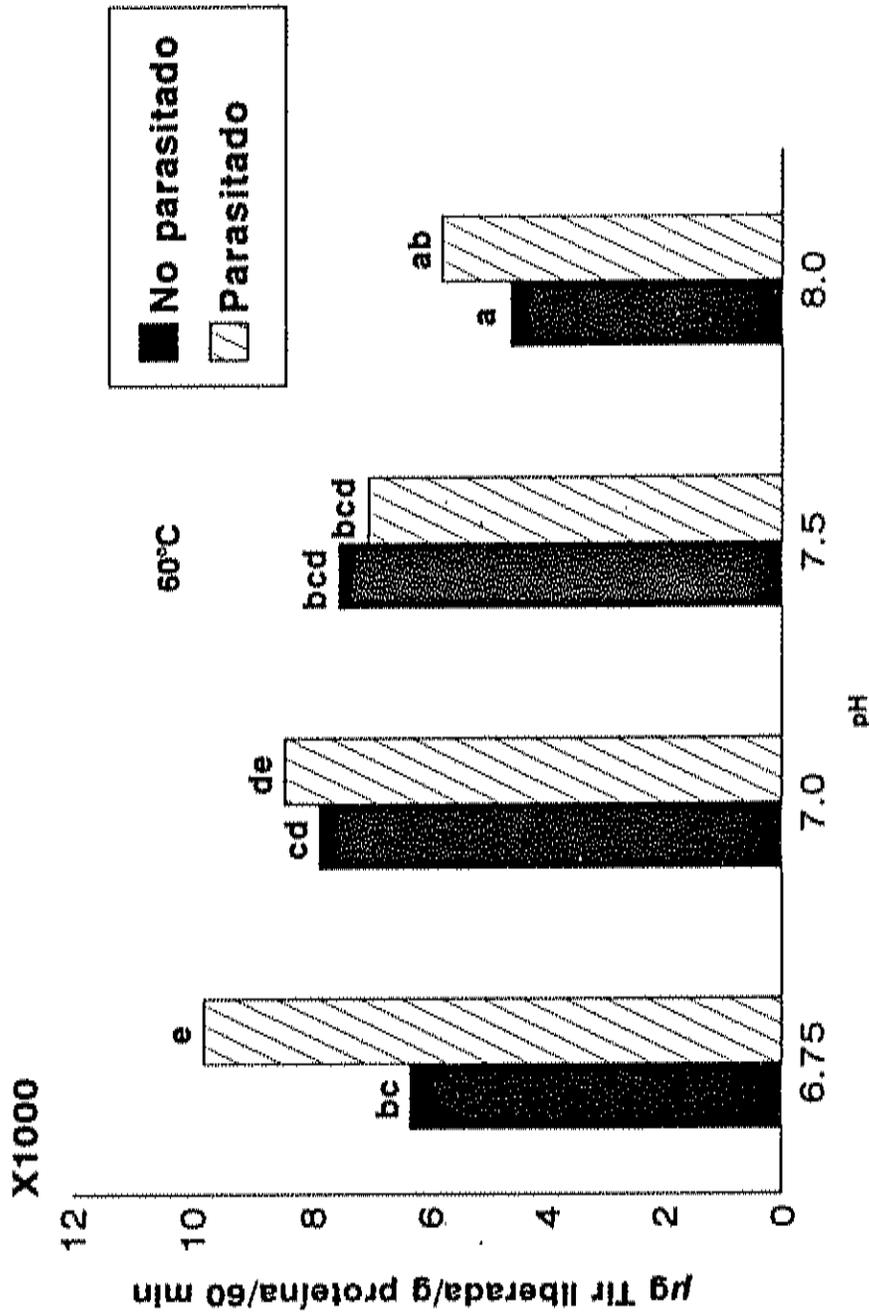
Por otro lado, cuando la actividad fue determinada a pH neutro y alcalinos a 50°C (Figura 5), se observó, en función del grado aparente de parasitación, un comportamiento inverso al reportado a pH ácidos. En el rango de pH 7.0-8.0, la actividad enzimática detectada en el músculo con menor grado de parasitación fue significativamente mayor ($p < 0.05$). Este mismo comportamiento fue reportado por Erickson *et al.*, (1983), en fluido sarcoplásmico de merluza del pacífico con diferente grado de parasitación, utilizando hemoglobina como sustrato. La literatura reporta que esta diferencia en actividad, se encuentra relacionada al grado de parasitación y al tipo de parásito que infesta al músculo de merluza. Por ejemplo, las enzimas secretadas por *Kudoa thyrsitidis* incrementan su actividad a pH's ácidos, mientras que las de *Kudoa paniformis* la incrementan tanto a pH ácido como neutro (Adlestein, 1991).

En el rango de pH 6.75-8.0, la actividad enzimática a 60 °C (Figura 6) fue similar independientemente del grado de parasitación aparente. No se



*Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (p<0.05).

Figura 5. Efecto del tipo de muestra de merluza de merluza del Pacífico (M. productus) sobre la actividad proteolítica a 50 °C y pH alcalino-neutro.



*Barras con letras diferentes son estadísticamente diferentes (p<0.05).

Figura 6. Efecto del tipo de muestra de merluza del Pacífico (M. productus) sobre la actividad proteolítica a 60 °C y pH alcalino-neutro.

observó diferencia significativa ($p > 0.05$) en la actividad entre los muestreos para cada uno de los pH en el rango 7.0-8.0. La actividad enzimática se mantuvo constante ($p > 0.05$) en ambos muestreos en el rango de pH 7.0-7.5.

Los resultados anteriores sirvieron de base para establecer las condiciones de pH 7.0 y 60 °C como las más convenientes para elaborar los hidrolizados aprovechando la actividad proteolítica en el músculo de merluza del pacífico, ya que la magnitud de la actividad enzimática fue independiente del grado aparente de parasitación. No obstante el haberse detectado mayor actividad a pH ácidos y temperaturas inferiores a 60 °C, ésta fue fuertemente dependiente del grado de parasitación.

La actividad enzimática a 60°C sugiere la presencia de proteinasas alcalinas termo-estables. La literatura reporta que esta actividad en músculo pudiera provenir de contaminación de órganos internos, principalmente hígado y riñón, durante la operación de eviscerado. El lavado de la cavidad visceral antes de la separación mecánica del músculo, pudiera ayudar en la eliminación o reducción de estas proteinasas (Su *et al.*, 1981; Martínez y Gilberg, 1988). Este efecto no fue evaluado en el presente estudio, no obstante se supone que, en función del manejo poscaptura al que se sometió la especie y los cuidados durante su eviscerado manual, la contaminación fue mínima.

Los resultados en esta sección del estudio, sugieren que la actividad enzimática detectada a pH ácidos y temperaturas menores de 50 °C, provienen principalmente de actividad catéptica endógena (An *et al.*, 1994;1995), de enzimas secretadas por los parásitos y/o por repuesta

inmunológica a esta infestación (Kudo *et al.*, 1987; Wasson, 1992; Seymour *et al.*, 1994; Patashnik *et al.*, 1982). Por otro lado, la actividad a pH neutro y alcalinos y temperaturas superiores a 50 °C, pudiesen ser el resultado de proteinasas alcalinas musculares (Asghar y Bhatti, 1987; Wasson, 1992) y/o contaminación de fluidos viscerales (Su *et al.*, 1981; Martínez y Gilberg, 1988) característicos de una alta actividad proteolítica.

De igual forma, los resultados sugieren que la actividad enzimática en el rango ácido pudiese ser la de mayor consideración para los procesos de reducción de calidad y deteriorativos, durante el manejo poscaptura del pescado y su posterior almacenamiento, mientras que la detectada a pH neutro y alcalino, durante procesos de transformación que impliquen tratamientos térmicos (Lugo-Sánchez *et al.*, 1995; Wasson, 1992; Tsuyuki *et al.*, 1982; Hamann *et al.*, 1990; Boye y Lanier, 1988).

Calibración del pH Stat

La producción de hidrolizados de proteínas con grado de hidrólisis controlada, requiere de la calibración del pH-stat para tener un mejor control en el proceso hidrolítico. Esto requiere la determinación del pK promedio de los péptidos resultantes de la hidrólisis de la proteína. La Figura 7 muestra las pendientes obtenidas entre los grupos aminos liberados y el consumo de base requerido para mantener el pH constante durante la hidrólisis de proteína del músculo de merluza. El pK promedio obtenido a 50 °C fue de 7.61 ± 0.01 de acuerdo a las pendientes obtenidas (ver materiales y métodos).

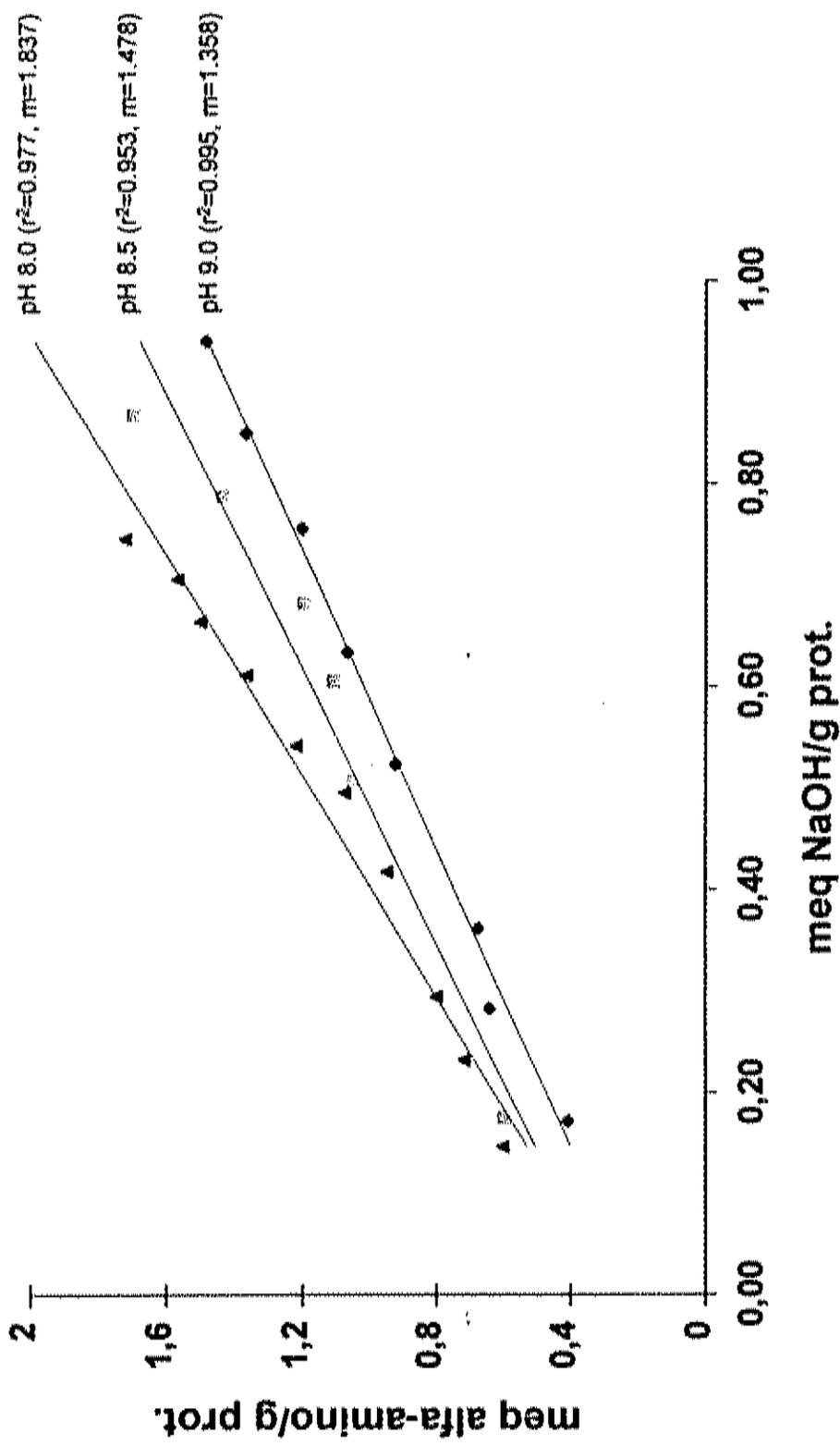


Figura 7. Curvas de calibración del pH stat por el método del TNBS

Este valor fue el utilizado para estimar el consumo de base a pH constante (pH= 8.0), requerido para obtener los GH del 10%, 15% y 20%.

El pK obtenido para las proteínas del músculo de merluza fue mas alto que el reportado para proteína de soya (pK=7.1 a 50°C), debido principalmente a la diferencia en composición de aminoácidos entre las proteínas (Adler-Nissen, 1986). Otra causa es que el pK incrementa a medida que aumenta el grado de hidrólisis; para la proteína de soya, el pK obtenido corresponde a grado de hidrólisis menor del 12% (Novo, 1978). En el presente estudio el GH mayor fue del 20%. Lo anterior hace necesario que siempre que se va a hidrolizar una proteína de diferente fuente, se calcule el pK para que de esta forma, el grado de hidrólisis (GH) estimado por el método del pH-stat sea más exacto.

Rendimiento del Proceso Hidrolítico

La literatura reporta (Adler-Nissen, 1986) que el pH al cual se realiza la separación de fracción soluble de la insoluble de los hidrolizados, tienen un efecto sobre el rendimiento de la primera. El rendimiento de esta fracción incrementa a medida que aumenta el pH en el rango 4.0-7.0, debido a que se da una menor precipitación de péptidos hidrofóbicos y de péptidos de alto peso molecular.

El grado de hidrólisis (GH) es otro factor a considerar en el rendimiento de la fracción soluble de los hidrolizados. El Cuadro 5 muestra el efecto del GH en la recuperación de proteína soluble después de la centrifugación,

respecto a la proteína total inicial de la muestra. Conforme aumentó el GH, la cantidad de proteína recuperada incrementó significativamente ($p < 0.05$). Un mayor GH produce en promedio polipéptidos de menor peso molecular (p.m.), simplificando con ello su estructura y aumentando su solubilidad. El GH del 20% recuperó en la fracción soluble aproximadamente el 70% de la proteína total en la muestra.

El análisis de regresión lineal entre las variables GH y recuperación de proteína soluble (RPS), mostró una dependencia altamente significativa entre ellas ($RPS = 2.53GH + 19.3$; $r = 0.9727$; $p < 0.001$).

Cuadro 5. Efecto del grado de hidrólisis (GH) sobre la recuperación de proteína en la fracción soluble de los hidrolizados.

Grado de Hidrólisis (%)	Proteína Recuperada (%)
5	28.9 ± 0.7^a
10	48.6 ± 1.9^b
15	58.6 ± 4.1^c
20	67.8 ± 1.4^d

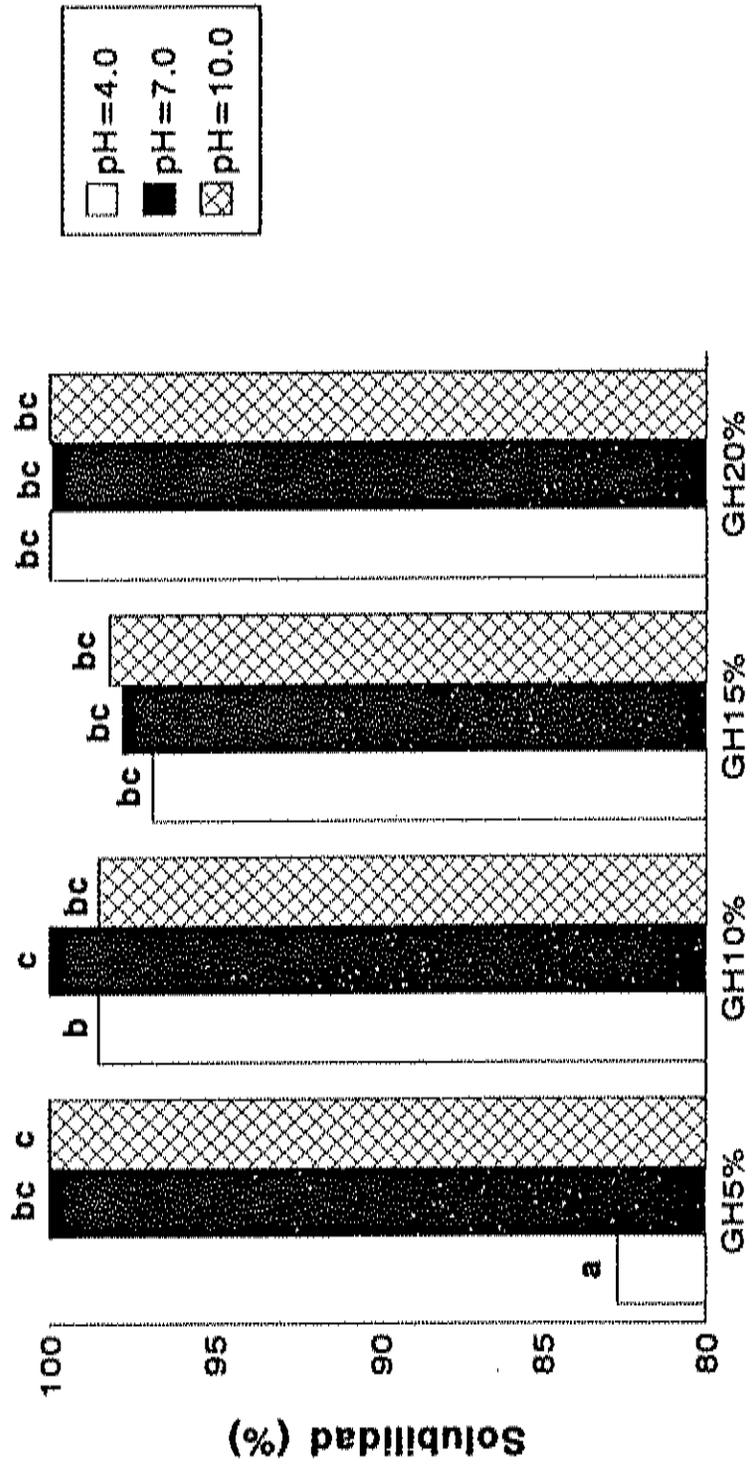
* Los valores son la media \pm D.S. de tres repeticiones. Valores con letra diferente son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Solubilidad

La solubilidad de proteínas y/o polipéptidos se ve afectada por varios factores, entre ellos el pH. La solubilidad de los hidrolizados obtenidos (Figura 8) superó al 80% en todos los pH evaluados. Los resultados muestran una ligera pero significativa ($p < 0.05$) tendencia de esta propiedad a aumentar conforme aumenta el GH (5%→20%) y el pH del medio (4→10). Resultados similares han sido reportados en la literatura (Mahmoud, 1994; Turgeon *et al.*, 1992; Adler-Nissen y Olsen, 1979 y Chobert *et al.*, 1988, 1989).

El efecto de mayor magnitud del GH sobre la solubilidad de los hidrolizados se observó a pH 4.0. Este resultado es particularmente importante, por la cercanía de este pH al pI promedio de las proteínas miofibrilares del músculo de pescado. La literatura reporta que la hidrólisis enzimática incrementa la solubilidad de los péptidos obtenidos en comparación con la de la proteína intacta, particularmente en el rango de pH 4.0-5.0 (Mahmoud 1994; Alder-Nissen, 1976; Shimizu *et al.*, 1986; Frokjaer, 1994).

La solubilidad mejorada de los hidrolizados se debió a la generación de péptidos de menor peso molecular (P.M.) (Turgeon *et al.*, 1992; Sekul y Ory, 1977), lo cual pudo corroborarse mediante la obtención y análisis de sus patrones electroforéticos (López-Vizcarra, 1995), donde para el GH del 5% se detectaron bandas bien definidas con P.M. de 31, 21.5, 14.4 y 6.5 kDa, con una acumulación de bandas por debajo de este último P.M. Los hidrolizados con grado de hidrólisis mayor (10%, 15% y 20%) presentaron una banda



*Barras con letras diferentes, son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$)

Figura 8. Efecto del pH y grado de hidrólisis (GH) sobre la solubilidad (%) de hidrolizados de merluza del Pacífico.

barrida que inicia con un valor superior de 6.5 kDa. La exposición de nuevos grupos amino y carboxilo resultantes del proceso hidrolítico generó un nuevo balance de cargas e hidrofobicidad, el cual podría incrementar el carácter hidrofílico de los hidrolizados, aumentando con ello su solubilidad (Mahmoud, 1994; Nakai, *et al.*, 1991).

La literatura reporta que hidrolizados de proteína de soya solubles en su punto isoeléctrico, retienen esta solubilidad hasta un pH de 2.5, cubriendo con ello el rango de pH de las bebidas donde pudieran ser utilizados (Adler-Nissen, 1986). En el presente estudio la solubilidad de los hidrolizados con diferente GH, solo fue evaluada al pH ácido de 4.0; sin embargo, se esperaría que la solubilidad a pH menores también fuese elevada por lo mencionado en el párrafo que antecede.

De igual forma, a medida que disminuye o aumenta el pH del medio respecto al pI de proteínas o polipéptidos, su carga neta, positiva o negativa respectivamente, tiende a aumentar, promoviendo con esto la repulsión molecular. Este principio también explica el comportamiento observado a pH 10. Lo anterior es de gran importancia ya que la solubilidad de los hidrolizados de proteína, en un rango amplio de pH, es una de las propiedades fisicoquímicas y funcionales más deseadas en un sistema alimentario. Otras propiedades funcionales requeridas, como capacidad de emulsificación, espumeo, adherencia, etc., dependerán primeramente de una buena solubilidad o capacidad de dispersión.

Por otra parte, la literatura reporta (Adler-Nissen, 1986) que cuando se preparan soluciones de hidrolizado a pH ácido, a pesar de ser 100% solubles,

pueden presentar cierta turbidez. Este comportamiento se observó en el presente estudio con las soluciones de hidrolizados preparados a pH 4.0 (datos no mostrados). Esta turbidez pudo ser debida a la formación de agregados que permanecieron en solución o suspensión en el medio, tal como lo reportan Adler-Nissen y Olsen (1979) y Turgeon *et al.*, (1992).

Los resultados de solubilidad obtenidos, abren una amplia gama de posibilidades para la utilización de los hidrolizados elaborados a partir de músculo de merluza del pacífico, como ingrediente alimentario funcional y nutricio en una amplia variedad de productos para consumo humano. Lo anterior, principalmente en bebidas, dentro de un amplio rango de pH tanto ácidos como alcalinos, tal como lo mencionan Sugimoto *et al.*, (1971) y Adler-Nissen (1976).

Propiedades Emulsificantes

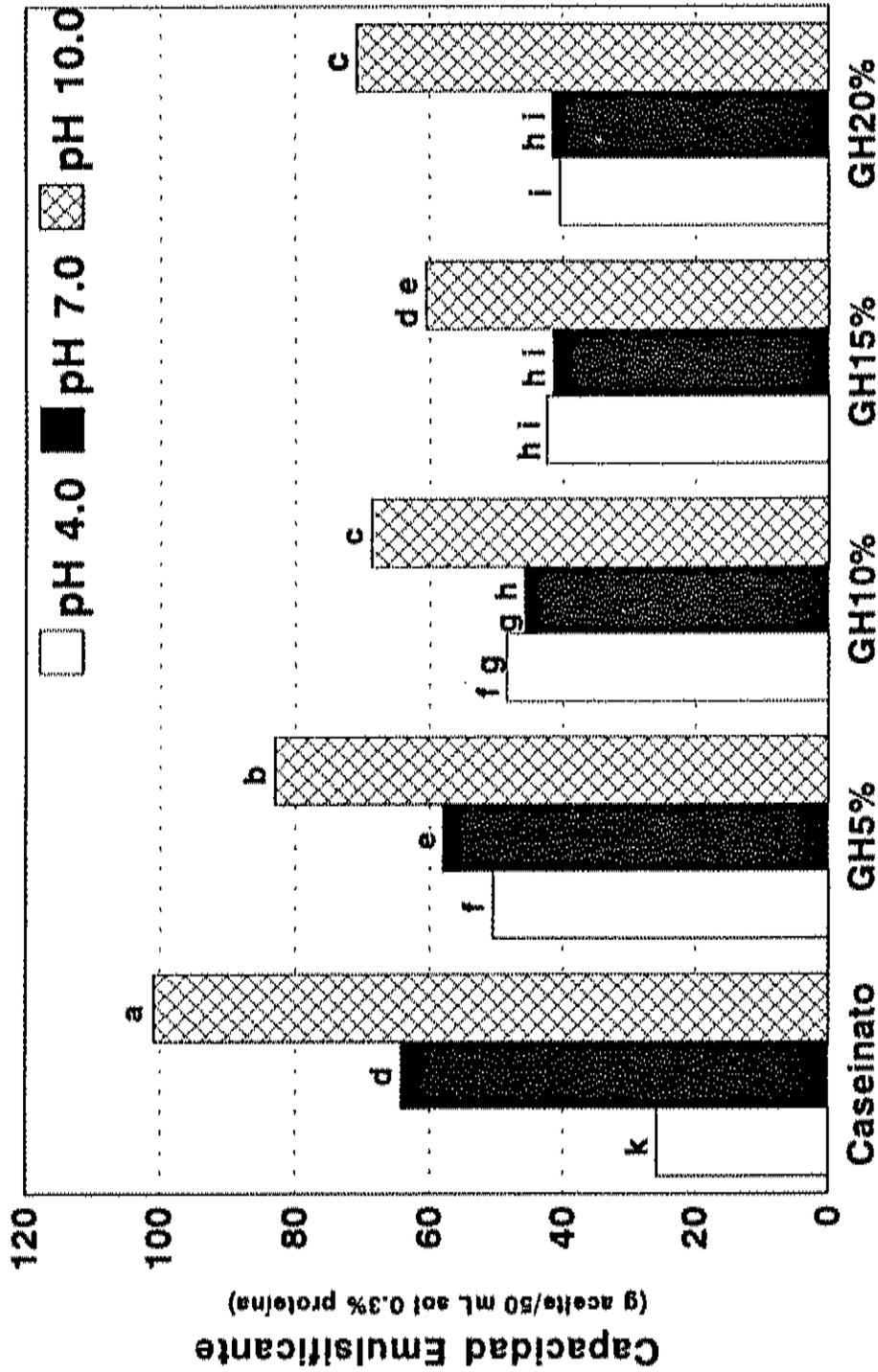
Las propiedades emulsificantes, capacidad emulsificante (CE), Índice de actividad emulsificante (IAE) e Índice de estabilidad emulsificante (IEE) de los hidrolizados producidos, se compararon con las de caseinato de sodio (CAS). Esta proteína se caracteriza por sus excelente capacidad emulsificante, lo que le permite ser utilizada en la elaboración de productos tales como embutidos cárnicos, panadería, cremas para café, aderezos para ensaladas, etc (Badui, 1984; Schut, 1976; Giese, 1994).

Los resultados indican que el GH y pH afectaron de forma significativa ($p < 0.001$) la capacidad emulsificante (CE) de los hidrolizados obtenidos

(Figura 9). En términos generales, se observó para la CE en cada uno de los GH, una tendencia significativa ($p < 0.05$) a aumentar conforme el pH varió de 4.0 a 10.0. Particularmente importante es la gran diferencia en CE a pH 10 comparada con los pH menores. La mayor CE a este pH puede ser explicada en términos de un desdoblamiento estructural más extensivo de los polipéptidos resultante de la repulsión de cargas negativas generadas a pH 10. Lo anterior permitiría una mayor interacción y orientación de los polipéptidos resultantes en la interfase aceite-agua, debido a una exposición más eficiente de los residuos hidrofílicos e hidrofóbicos en estas moléculas, tal como lo mencionan Fligner y Mangino (1991).

Bajo las condiciones experimentales del presente trabajo, la máxima ($p < 0.05$) CE de 83 g aceite emulsificado/50 mL de sol. 0.3% de proteína, se obtuvo para el hidrolizado con un GH del 5% a pH 10. Estos resultados pueden ser explicados, además del efecto del pH en el desdoblamiento estructural mencionado en el párrafo anterior, a que el GH del 5% resulta en polipéptidos de mayor P.M. (López-Vizcarra, 1995) y por lo tanto con capacidad de cubrir una mayor área del glóbulo de grasa. De igual forma, estos polipéptidos pudiesen poseer características estructurales, de composición y distribución de aminoácidos, similar a los de la cadena pesada de la miosina, molécula conocida como un emulsificante natural (Schut, 1976)

Los resultados en la Figura 9, muestran una tendencia significativa ($p < 0.05$) de la CE a disminuir conforme aumenta el GH. Los resultados de la Figura 8 sugieren que para fines prácticos se podría considerar que la solubilidad o capacidad de difusión a la interfase agua:aceite de los hidrolizados es la misma, independientemente del GH y pH, salvo para la



*Barras con letras diferentes, son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). $n = 3$.

Figura 9. Efecto del pH y grado de hidrólisis (GH) sobre la capacidad emulsificante (CE) de hidrolizados de merluza del Pacífico y su comparación con caseinato.

condición GH 5% pH 4. En base a esta consideración, las diferencias observadas en CE podrían explicarse en función de diferencias en el P.M., y por ende de su longitud, de los polipéptidos que constituyen los hidrolizados a los diferentes GH. A este respecto, los hidrolizados con un GH del 5% presentan polipéptidos de mayor p.m. según sus patrones electroforéticos. Para este GH se obtuvo mayor ($p < 0.05$) CE a pH 7 y 10 al compararse con los pH correspondientes de GH mayores. Los resultados obtenidos corroboran lo publicado por Gauthier *et al.*, (1993), donde reportan buenas correlaciones entre actividad superficial y longitud de la cadena del péptido.

El efecto del pH en la CE resultó ser más pronunciado en los hidrolizados con un GH del 5%. La CE fue diferente ($p < 0.05$), disminuyendo conforme el pH también disminuye, dando valores de 83, 58 y 50 g aceite emulsificado/50 mL de sol. 0.3% de proteína para los pH 10, 7 y 4 respectivamente.

A GH mayores no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) en la CE de los hidrolizados entre los pH 4 y 7. Los polipéptidos de menor P.M. obtenidos a mayores GH, no vieron afectada su solubilidad (Figura 8) al disminuir el pH, y posiblemente tampoco en grado apreciable, el desdoblamiento molecular y grado de exposición de residuos hidrofóbicos por lo que su CE no se modificó ($p > 0.05$). No obstante, para el GH del 5%, la reducción significativa en solubilidad de los hidrolizados al pasar de pH 7 a 4 (Figura 8), resultó de una agregación molecular producto de una precipitación isoeléctrica parcial a pH 4 (Adler-Nissen, 1986; Shimizu *et al.*, 1986), reduciendo la accesibilidad de grupos hidrofóbicos y por lo tanto una reducción significativa de su CE.

En términos generales, e independientemente del pH, los resultados indican que a menor GH la CE de los hidrolizados es mayor, ya que los polipéptidos resultantes podrían aún semejar la estructura, composición y distribución de aminoácidos de la cadena pesada de la miosina. La literatura reporta resultados similares, donde se establece que las propiedades emulsificantes de proteínas han sido mejoradas en forma significativa a GH menores al 10%, particularmente en proteína de soya (Adler-Nissen, 1986; Fher y Halasz, 1989; Puski, 1975; Kim *et al.*, 1990), leche (Fher y Halasz, 1989; Chobert *et al.*, 1988; Shimizu *et al.*, 1984; Mahmoud *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1987a, 1987b), y pescado (Quaglia y Orban, 1990). Adler-Nissen y Olsen (1979) reportaron un incremento en la CE de proteína de soya hidrolizada con un GH del 5% utilizando una proteasa fungal; sin embargo, cuando el GH se incrementó al 9%, esta propiedad disminuyó drásticamente.

La CE de los hidrolizados producidos, independientemente de su GH, fue mayor ($p < 0.05$) que la de CAS a pH 4. Para los pH 7 y 10, los resultados fueron inversos (Figura 9). Lo anterior confiere a los hidrolizados producidos, ventajas sobre la CAS de ser utilizados como ingrediente alimentario en sistemas emulsificados ácidos.

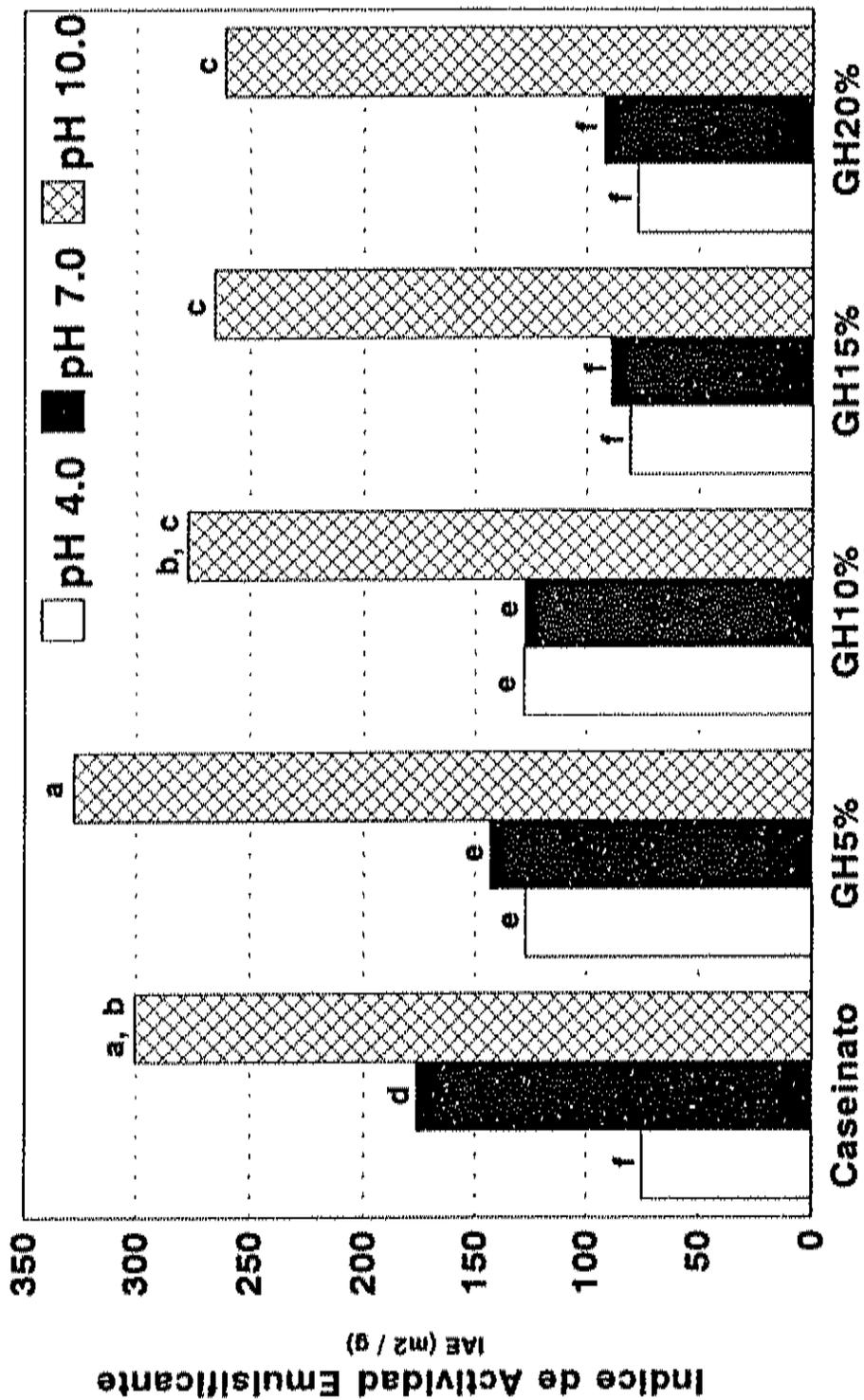
Otra técnica utilizada en la evaluación de las características emulsificantes de los hidrolizados, es la determinación de su índice de actividad emulsificante (IAE). La prueba se basa en la relación entre la turbidez de una emulsión y su área interfaseal, la cual está relacionada con la capacidad de la proteína para absorberse y estabilizar la interfase aceite:agua. Para esta determinación, la relación proteína:aceite requerida para la formación de la emulsión se mantiene constante en todas las muestras,

mientras que en la determinación de CE, la solución proteica es titulada con aceite hasta observar el rompimiento de la emulsión.

El comportamiento del IAE (Figura 10) es similar al observado para CE (Figura 9), debido a que la propiedad funcional determinada es la misma, solo que se basa en diferente principio. Un mayor IAE implica una mayor turbidez en la emulsión, lo que a su vez representa una mayor área interfaseal en el sistema agua:aceite. Los glóbulos de grasa formados son de menor tamaño y por ende más numerosos. Un mayor IAE implica igualmente la posibilidad de producir emulsiones más finas. Si el agente emulsificante empleado es material proteico, además de su concentración se deben considerar sus características fisicoquímicas y funcionales como p.m., solubilidad, composición de aminoácidos, hidrofobicidad, etc.

Nuevamente fue evidente una mayor ($p < 0.05$) funcionalidad en términos de IAE de los hidrolizados a pH 10, independientemente del GH. Los resultados indican que para CE y IAE el pH es el factor de mayor consideración en la definición de estas características. No se detectó diferencia ($p > 0.05$) en IAE entre los GH 5% y 10% y entre los GH 15% y 20% para los pH 4 y 7. El IAE de los GH 5% y 10% fue mayor a la CAS a pH 4.

Un mayor IAE implica una mayor habilidad de los polipéptidos a absorberse en la interfase agua:aceite y una mayor área interfaseal. Los resultados indican que los factores con mayor influencia en la definición de



*Barras con letras diferentes, son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). $n = 3$.

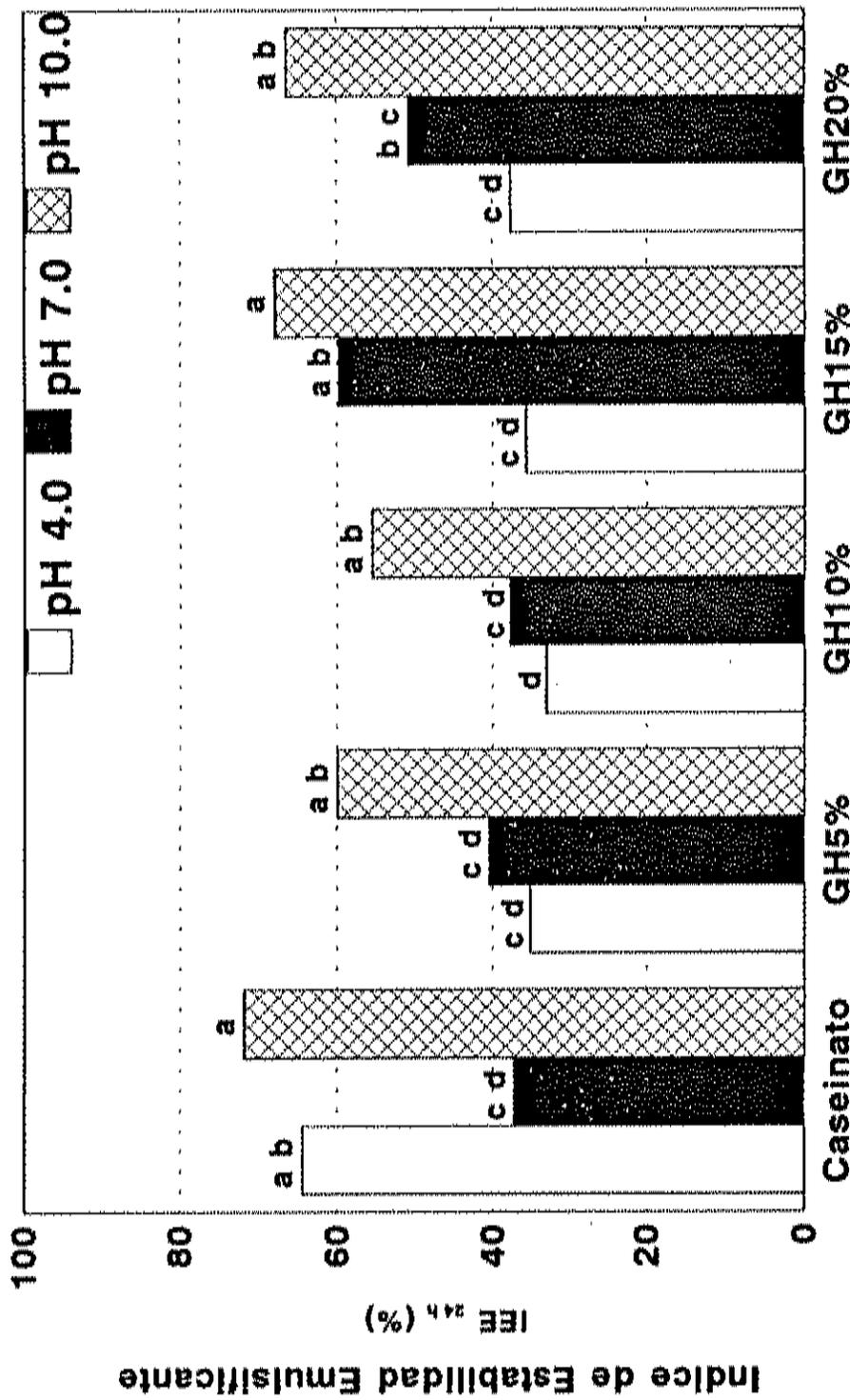
Figura 10. Efecto del pH y grado de hidrólisis (GH) sobre el índice de actividad emulsificante (IAE) de hidrolizados de merluza del Pacífico y su comparación con caseinato.

este Índice son el GH y el pH. La explicación de estos efectos ha sido descrita anteriormente durante el análisis de la CE.

El comportamiento del Índice de Estabilidad Emulsificante (IEE) se muestra en la Figura 11; este Índice proporciona información sobre la estabilidad de las emulsiones formadas. Para cada GH, el comportamiento entre el IAE y IEE fue similar. Nuevamente, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en esta propiedad funcional a pH 10 respecto a pH menores; no se observó diferencia entre los diferentes GH a este pH. Valores mayores de IEE indican que las emulsiones perdieron menos turbidez después de 24 horas de reposo y por lo tanto son más estables.

A diferencia de los comportamientos de la CE (Figura 9) e IAE (Figura 10), el IEE mostró una tendencia, aunque no significativa en la mayoría de los casos, a aumentar conforme aumentó el GH. El efecto del pH en el aumento del IEE se observó de manera más pronunciada en los GH del 15% y 20%.

Bernardi *et al.*, (1991), reportaron que mediante la proteólisis de un concentrado de proteína de soya con proteinasas fungal y bacterial, la capacidad emulsificante es mejorada, pero la estabilidad de la emulsión disminuye a GH por arriba del 10%. En el presente trabajo no se observó una disminución en la estabilidad de la emulsión conforme aumentó el GH. Esta no concordancia en resultados puede deberse a diferencias en la composición de aminoácidos y su distribución en los polipéptidos resultantes de la hidrólisis, ya que se trata de dos proteínas completamente diferentes. A este respecto, Waniska y Kinsella (1979) han reportado que el desarrollo interfaseal de las proteínas, lo cual puede ser aplicado también a



*Barras con letras diferentes, son estadísticamente diferentes (p<0.05). n=3.

Figura 11. Efecto del pH y grado de hidrólisis (GH) sobre el índice de estabilidad emulsificante (IEE) de hidrolizados de merluza del Pacífico y su comparación con caseinato.

polipéptidos, esta influenciado por la composición de aminoácidos y conformación de las mismas.

El IEE (Figura 11) de los hidrolizados fue semejante ($p > 0.05$) al de CAS a pH 7, a excepción del GH15% el cual mostró mayor estabilidad de las emulsiones al mismo pH, siendo a pH 4 el CAS mayor ($p < 0.05$) a todos los hidrolizados.

La literatura reporta que el peso molecular de los polipéptidos resultantes tiene una gran influencia en las propiedades emulsificantes de los hidrolizados; varios reportes han sugerido que hay un tamaño molecular óptimo o longitud de cadena para proveer buenas propiedades emulsificantes (Lee *et al.*, 1987a; 1987b; Adler-Nissen y Olsen, 1979; Mahmoud, 1994).

Los resultados indican que el efecto del pH fue aún más marcado que el del GH sobre las propiedades emulsificantes de los hidrolizados. El pH 10 generó el mayor desdoblamiento y exposición de las regiones hidrofóbicas en las moléculas de polipéptidos facilitando una mejor reorientación de estos en la interfase agua:aceite. El aumento en las propiedades emulsificantes a este pH sugiere también que no se generó una repulsión molecular apreciable entre los polipéptidos por la densidad de carga negativa en su superficie, permitiendo por lo tanto una buena interacción polipéptido-polipéptido, resultando en una interfase cohesiva y más estable lo cual retarda la coalescencia de la emulsión.

Propiedades Espumantes

Los resultados de las características espumantes de los hidrolizados producidos se compararon con las propiedades espumantes de seroalbúmina bovina (SAB), ya que esta proteína se caracteriza por ser una eficiente formadora de espumas (Waniska y Kinsella, 1979; Katoet *et al.*, 1983; Altea-Ann y Nakai, 1983; Yu y Damodaran, 1991a; Ferreira *et al.*, 1995).

La literatura reporta que el proceso de hidrólisis enzimática resulta en un incremento de las características espumantes de las proteínas (Adler-Nissen, 1986). Estudios han demostrado que la hidrólisis de proteína de soya a un GH del 10% produce un mejoramiento en la capacidad espumante, sin embargo, la estabilidad de la espuma producida fue baja (Adler-Nissen, 1986). En el presente estudio, la capacidad espumante (CEsp) de los hidrolizados resultó ser menor ($p < 0.05$) comparada con SAB, lo cual se manifestó en un menor volumen de espuma producida por mL de solución proteica (Cuadro 6). El GH no mostró un efecto significativo ($p > 0.05$) en la CEsp de los hidrolizados producidos (Cuadro 6), dando conjuntamente un valor promedio de 2.93 ± 0.1 , inferior ($p < 0.05$) a los de SAB de 5.5, 5.2 y 9.6 para los pH 4, 7 y 10 respectivamente; el pH afectó ($p < 0.05$) la CEsp de esta última proteína.

El efecto que tiene el pH sobre la capacidad espumante ha sido evaluado por varios investigadores (Kuehler y Stine, 1974; Phillipset *et al.*, 1990; Zhu y Damodaran, 1994). Kuehler y Stine (1974), evaluaron la capacidad espumante de un hidrolizado de proteína de suero de leche encontrando que a mayor carga neta (pH 2 y 9), las proteínas tienen una mayor tendencia hacia

la formación de espuma, produciendo valores más altos de volumen específico (mL espuma/g), siendo esta tendencia menor en el rango del punto isoelectrico. Sin embargo, a estos pH la estabilidad de las espumas no fue buena. En el presente estudio no se observó un efecto del pH sobre la CEsp de los hidrolizados, no obstante el efecto sobre las características de estabilidad de la espuma fue relevante.

Cuadro 6. Efecto del pH y grado de hidrólisis (GH) sobre la capacidad espumante (CEsp) de hidrolizados de merluza del Pacífico y su comparación con albúmina.

	Capacidad Espumante (mL Espuma/mL solución 0.3% proteína)		
	pH = 4.0	pH 7.0	pH 10.0
Albúmina	5.5 ± 0.1 ^a	5.2 ± 0.2 ^a	9.6 ± 0.4 ^b
GH5%	3.0 ± 0.0 ^c	3.0 ± 0.1 ^c	3.0 ± 0.0 ^c
GH10%	2.8 ± 0.1 ^c	3.0 ± 0.0 ^c	3.0 ± 0.0 ^c
GH15%	2.8 ± 0.1 ^c	2.9 ± 0.1 ^c	3.0 ± 0.0 ^c
GH20%	2.8 ± 0.1 ^c	2.9 ± 0.0 ^c	2.9 ± 0.1 ^c

* Valores con letras diferentes son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

La capacidad espumante de una proteína es importante, sin embargo la estabilidad de la espuma es de mayor relevancia. Esta última puede ser evaluada respecto al tiempo, midiendo el decaimiento del volumen de espuma,

viscosidad, conductividad o líquido drenado entre otros. La técnica de la medición del volumen de "líquido drenado" o "goteo de la espuma" a los 5 minutos, fue la utilizada en el presente estudio.

A diferencia de los resultados obtenidos para CEsp, tanto el pH como el GH tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la estabilidad espumante (EEsp) de los hidrolizados. La Figura 12, muestra el efecto marcado que a pH 4.0 tiene el GH sobre la estabilidad de la espuma. A este pH, el rango de valores promedio de EEsp varió de un máximo de 40.5% para el GH de 5%, al mínimo de 0% para los GH de 15 y 20% a un tiempo de 5 minutos. El efecto del GH se redujo conforme aumentó el pH; para el pH 7 (Figura 13), los valores máximo y mínimo del rango fueron de 32.6% (GH 5%) y 9.0% (GH 20%) respectivamente, mientras que para el pH 10 (Figura 14) de 18.1% (GH 10%) y 7.9% (GH 20%).

El pH y GH al cual los hidrolizados mostraron una mayor ($p < 0.05$) EEsp fue de 4 y 5% respectivamente. Bajo estas condiciones, se obtuvo un valor de EEsp de 40.4%, prácticamente el doble del valor obtenido para la EEsp de SAB (22.0%). A pH 7, la EEsp de SAB fue igual ($p > 0.05$) a la de los GH 5% y 10%, mientras que a pH 10 a la de los GH 5%, 10% y 15%. Los resultados son concluyentes respecto a las extraordinarias características de estabilizadores de espumas que presentan los hidrolizados de GH 5%, 10% y 15%, similares e incluso superiores a los de SAB.

La EEsp de la SAB no se vio afectada ($p > 0.05$) por el pH, obteniéndose un valor promedio considerando los tres pH de $23.4\% \pm 5.0$ a los 5 minutos. Tampoco se observó diferencia ($p > 0.05$) en la EEsp de los

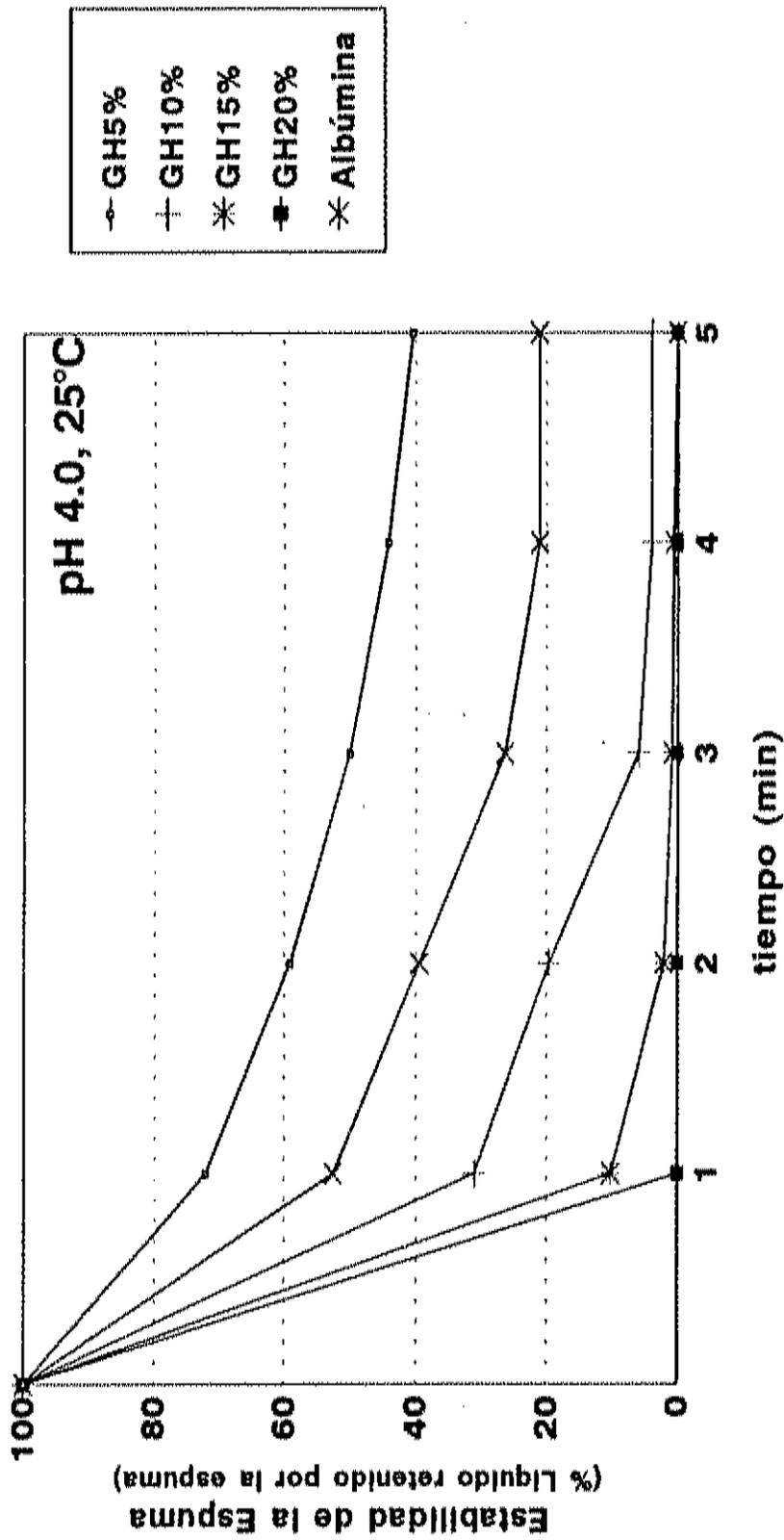


Figura 12. Efecto del grado de hidrólisis(GH) y pH 4.0 sobre la estabilidad de la espuma(EEsp) de hidrolizados de merluza del Pacífico y su comparación con albúmina.

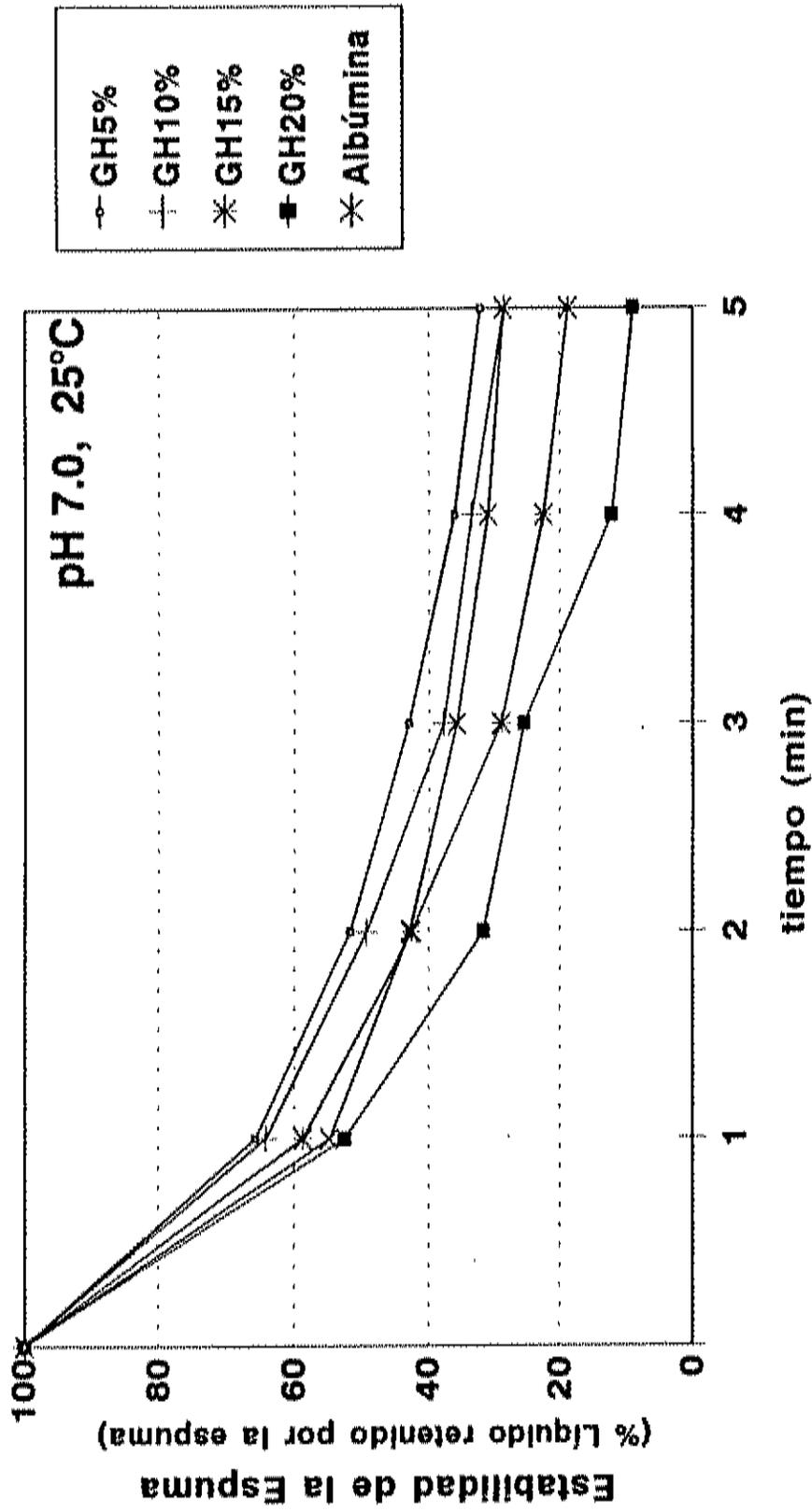


Figura 13. Efecto del grado de hidrólisis (GH) y pH 7.0 sobre la estabilidad de la espuma (EEsp) de hidrolizados de merluza del Pacífico y su comparación con albúmina.

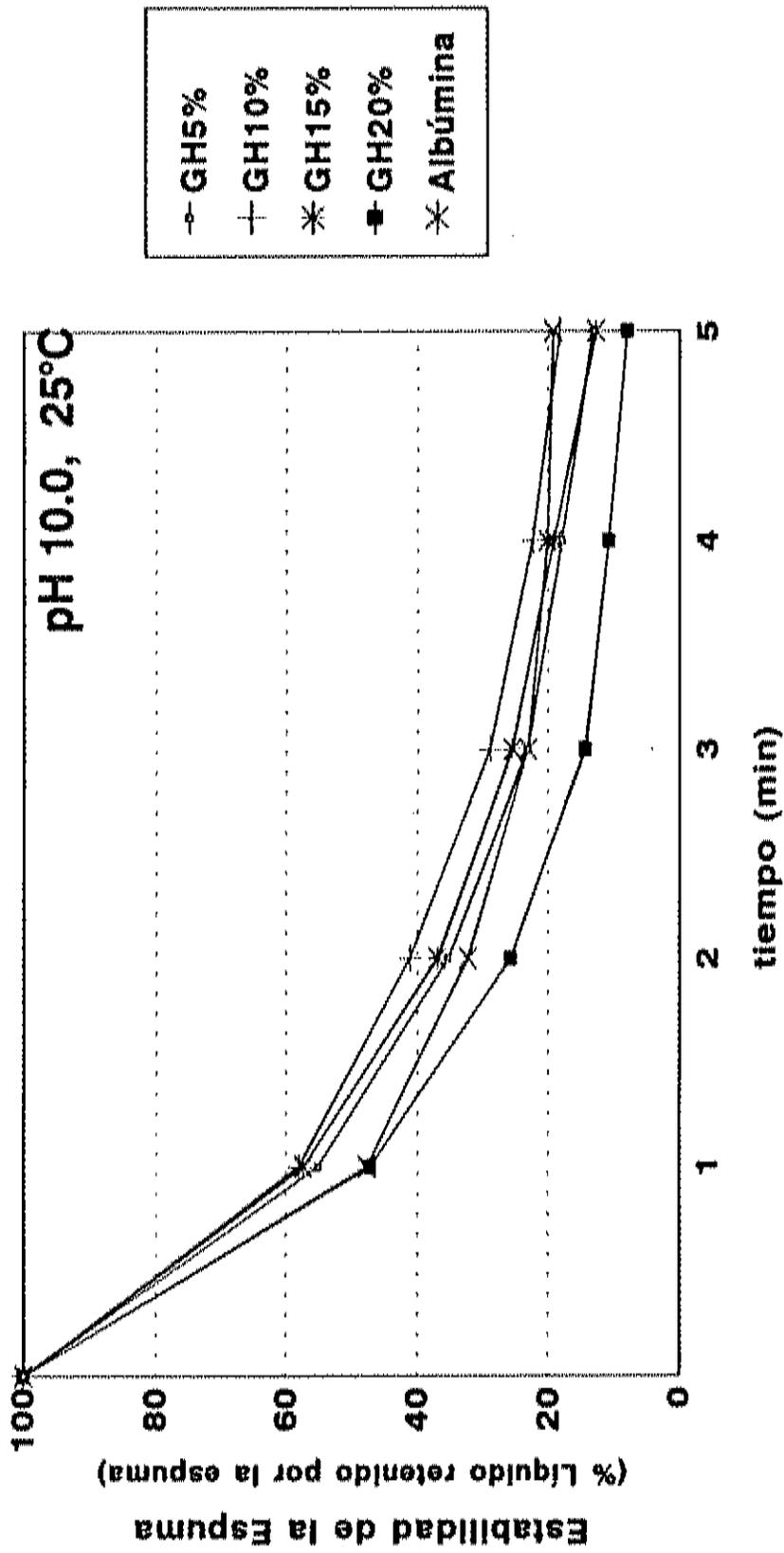


Figura 14. Efecto del grado de hidrólisis (GH) y pH 10.0 sobre la estabilidad de la espuma (EEsp) de hidrolizados de merluza del Pacífico y su comparación con albúmina.

hidrolizados de GH 5% entre los pH 4 y 7, dando un valor promedio considerando ambos pH de $36.3\% \pm 5.9$. Los resultados de las propiedades espumantes de la SAB concuerdan con lo reportado en la literatura (Graham y Phillips, 1976), en el sentido de que proteínas que presentan buena capacidad espumante, al parecer no poseen propiedades moleculares que garanticen una buena estabilidad de la espuma formada.

Los resultados muestran que los hidrolizados con GH de 20% resultan en las espumas menos estables. Este resultado se observó más drástico a pH 4.0. Halling (1981) ha reportado que conforme aumenta el GH de los hidrolizados la estabilidad de la espuma que forman disminuye.

Los resultados concuerdan con lo reportado por Turgeon *et al.*, (1991), Mahmoud (1994) y Zhu y Damodaran (1994), en donde establecen que los péptidos de menor tamaño (mayor GH) difunden rápidamente y se absorben a la interfase aire:agua mostrando una alta CEsp. Sin embargo estos péptidos son menos eficientes en reducir la tensión interfaseal debido a que no pueden desdoblarse y reorientarse sobre la interfase como lo harían las proteínas o polipéptidos de mayor P.M.. En el caso del hidrolizado con un GH del 5%, la presencia de polipéptidos con un P.M. mayor proporciona una mayor estabilidad a la espuma, donde además el pH va a presentar un efecto adicional por los cambios estructurales que provoca en la molécula.

La literatura reporta que la estabilidad de las espumas formadas por proteínas globulares como SAB y ovoalbúmina, es generalmente mayor cuando el pH del medio es cercano a su punto isoelectrico, siempre y cuando no hayan perdido solubilidad (Yu y Damodaran, 1991a; Zhu y Damodaran,

1994). La mayor EEsp obtenida para el hidrolizado con un GH de 5% a un pH de 4.0 se puede explicar en los mismos términos descritos por Yu y Damodaran (1991a) y Zhu y Damodaran (1994). A pH cercanos al punto isoeléctrico de las proteínas o polipéptidos, la ausencia de repulsiones electrostáticas promueve interacciones cohesivas entre estas moléculas. Esto resulta en un mejoramiento de propiedades mecánicas y viscoelásticas de la película proteica que rodea a la burbuja de aire. La carencia de repulsión electrostática entre las moléculas absorbidas y su acercamiento a la interfase, mejora el recubrimiento superficial y la formación de multicapas, incrementando con ello su viscosidad; esta alta viscosidad de la película vendría a retardar el drenado del fluido haciendo a la espuma más estable.

Anteriormente se mencionó que el pH 10 mejoró las propiedades emulsificantes de los hidrolizados; por el contrario, este mismo pH resultó en una reducción de la EEsp. Este comportamiento puede deberse a que en el caso de las espumas (dispersión aire:agua) a diferencia de las emulsiones (dispersión aceite:agua), la repulsión electrostática entre los polipéptidos originada de la densidad de carga negativa presente, fue lo suficientemente grande para desestabilizar la interfase reduciendo su cohesividad dando lugar a un mayor drenado de fluido.

El Cuadro 7 muestra la matriz de correlación entre los efectos principales (pH y GH) y las propiedades funcionales (Sol., CE, IAE, IEE, CEsp y EEsp), evaluadas en el presente estudio. Los resultados descritos muestran que el pH ejerce un mayor efecto en la definición de las características funcionales de los hidrolizados producidos.

Cuadro 7. Matriz de correlación entre los efectos principales (pH y GH) y las propiedades funcionales evaluadas.

	IAE	IEE	CE	CEsp	Solubilidad
pH	0.839 (0.000)	0.784 (0.000)	0.763 (0.000)	0.476 (0.003)	0.415 (0.012)
GH	-0.258 (0.129)	0.235 (0.167)	-0.371 (0.026)	-0.535 (0.001)	0.330 (0.049)
IAE		0.614 (0.000)	0.927 (0.000)	0.446 (0.006)	0.197 (0.251)
IEE			0.507 (0.002)	0.305 (0.071)	0.267 (0.116)
CE				0.442 (0.007)	0.186 (0.277)
CEsp					-0.209 (0.222)

* Coeficiente de correlación r. ()= significancia. n= 36.

CONCLUSIONES

La alta actividad enzimática en músculo de merluza del Pacífico reduce considerablemente la posibilidad de que esta especie sea utilizada para consumo directo en sus presentaciones de fresco, fresco-congelado y enlatado entre otras. Ante este inconveniente, la aplicación de tecnologías como la producción de surimi y/o hidrolizados funcionales, genera alternativas para su utilización en la producción de ingredientes alimentarios. Estos ingredientes deberán ser altamente funcionales, lo cual se logra mediante un control adecuado durante su proceso de elaboración.

En el presente estudio se elaboraron hidrolizados a partir de músculo de merluza del Pacífico. Los resultados sugieren que los hidrolizados producidos pueden ser utilizados, en un amplio rango de pH, como ingredientes o aditivos alimentarios para impartir o mejorar la estabilidad de algunos alimentos, actuando como agentes emulsificantes, espumantes o dispersantes, en productos tales como embutidos, aderezos y mayonesas, bebidas, cremas, etc. Bajo ciertas condiciones específicas de GH y pH, los hidrolizados de músculo de merluza del Pacífico podrían substituir satisfactoriamente a componentes funcionales, como el caseinato de sodio y la seroalbúmina bovina, comúnmente utilizados en la formulación de alimentos.

Los resultados mostraron que tanto el efecto del GH como el del pH fueron significantes ($p < 0.05$); sin embargo, el más relevante en la definición de la funcionalidad de los hidrolizados fue el pH.

El hidrolizado con un GH del 5% presentó mejores características funcionales que los de mayor GH. Este resultado indica la posibilidad de hacer uso de la actividad presente en el músculo, sin tener que recurrir a la adición de preparaciones comerciales en la producción de hidrolizados a partir de esta especie.

La producción de hidrolizados altamente funcionales a partir de la hidrólisis enzimática de proteínas del músculo de especies marinas de bajo valor comercial, puede constituirse, en nuestro país, en una tecnología viable para aprovechar un vasto recurso pesquero como la merluza y de este modo poderla utilizar en la elaboración de alimentos para consumo humano directo.

BIBLIOGRAFIA

- Adler-Nissen, J. 1976.** Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility Fish protein concentrate, soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* 24:1090-1093.
- Adler-Nissen, J. 1977.** Enzymatic hydrolysis of food proteins. *Process. Biochem.* 12(6):18-23, 32.
- Adler-Nissen, J. 1979.** Determination of the Degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzene sulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* 27:1256-1262.
- Adler-Nissen, J. y Olsen, H.S. 1979.** The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. In "Functionality and Protein Structure, A. Pour-EI (Ed.), American Chemical Society. Symposium Series 92, Washington, DC. p.125-146.
- Adler-Nissen, J. 1986.** *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins.* Elsevier Applied Science. London.
- Adlestein, G.S. 1991.** Interactions between *Kudoa paniformis* and the offshore Pacific whiting (*Merluccius productus*) population. Disertación Doctoral. School of Fisheries, University of Washington.
- Althea-Ann, T. y Nakai, S. 1983.** Relationships between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins. *J. Food Sci.* 48:588.

- An, H., Weerasinghe, V., Seymour, T.A. y Morrissey M.T. 1994.** Cathepsin degradation of Pacific whiting surimi proteins. *J. Food Sci.* 59:1013-1017.
- An, H., Peters, M.Y. Seymour, T.A. y Morrissey, M.T. 1995.** Isolation and activation of cathepsin L-inhibitor complex from Pacific whiting (*Merluccius productus*). *J. Agric. Food Chem.* 43:327-330.
- Anderson, M., Brooker, B.E. y Needs, E.C. 1987.** The role of protein in the stabilization/destabilization of dairy foams. En: "Food Emulsions and Foams". p. 100. Ed. Dickinson, E. Royal Society of Chemistry. London.
- Anglemier, A.F. y Montgomery, M.W. 1985.** Amino acids, peptides, and proteins. p. 205-285. En "Principles in food science". Part 1: Food chemistry. Ed. Fennema, O.R. Marcel Dekker, Inc. USA.
- A.O.A.C. 1990.** Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, V.A.
- Arai, S., Yamashita, M. y Fujimaki, M. 1972.** Glutamyl oligopeptides as factors responsible for tastes of a proteinase-modified soybean protein. *Agric. Biol. Chem.* 36:1253-1256.
- Arteaga, G.E., Li-Chan, E., Cofrades, S. y Jimenez-Colmenero. 1993.** Ingredient interaction effects on protein functionality: Mixture design approach. *J. Food Sci.* 58:656-662.

- Arteaga, G.E. y Nakai, S. 1993.** Predicting protein functionality with artificial neural networks: Foaming and emulsifying properties. *J. Food Sci.* 58: 1151-1156.
- Asghar, A. y Bhatti, A.R. 1987.** Endogenous proteolytic enzymes in skeletal muscle: Their significance in muscle physiology and During posmortem in carcasses. *Adv. Food Res.* 31:343.
- Baca, D.R., Peña-Vera, M.T. y Díaz-Castañeda, M. 1991.** Production of fish protein hidrolysates with bacterial proteases; Yield and nutritional value. *J. Food Sci.* 56: 309.
- Badui, D.S. 1984.** *Química de los Alimentos.* 2da. reimpresión. Editorial Alhambra Mexicana. México, D.F. p. 207.
- Baldwin, R.E. y Sinthavala, S. 1974.** Fish protein concentrate foam. *J. Food Sci.* 39:880-882.
- Bycowski, P.J. 1990.** The preparation of cath for preservation and marketing. En "Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation". p. 77-92. Sikorki, Z.E (Ed.). CRC Press, Inc. USA.
- Behnke, U., Jurisova, E., Belajova, E., Haas, J. y Blumhagen, H. 1989** Enzymatic hydrolysis of maize protein. *Nahrung* 33(4):361-376.
- Bernardi, L.S.D., Pílosof, A.M.R. y Batholomai, G.B. 1991.** Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68(2):102-105.

Boye, S.W. y Lanier, T.C. 1988. Effects of heat-stable alkaline protease activity of atlantic menhaden (*Brevoortia tyrannus*) on surimi gels. *J. Food Sci.* 53: 1340-1342, 1398.

Caldwell, K.A. 1980. In vitro digestion of gliadin by gastrointestinal enzymes and by pyrrolidonecarboxylate peptidase. *Am. J. Clinical Nutr.* 33(2) p. 293-302.

Chang-Lee, M.V. 1988. The production of surimi from Pacific whiting (*Merluccius productus*) and evaluation of kamaboko gels. Thesis of Master in Science. Oregon State University.

Chaveesuk, R., Smith, J.P. y Simpson, B.K. 1993. Production of fish sauce and acceleration of sauce fermentation using proteolytic enzymes. *J. Aquatic Food Product Technology.* 2(3):59-77.

Chobert, J. M., Bertrand-Hard, C. y Nicholas, M.G. 1988. Solubility and Emulsifying Properties of Caseins and Whey proteins modified enzymatically by trypsin. *J. Agric. Food Chem.* 38:883-892.

Chobert, J.M., Bertrand-Harb, C., Dalgalarrrondo, M. y Marie-Georgette, N. 1989. Solubility and emulsifying properties of beta-casein modified enzymatically by trypsin. *J. Food Biochem.* 13:335-352.

Cofrades, S., Careche, M. y Jiménez-Colmenero, F. 1993. Protein concentration, pH and ionic strength affect appparent viscosity of actomyosin. *J. Food Sci.* 58: 1269-1272

- Crawford, D.L., Law, D.K., Babbit, J.K y McGill, L.A. 1979.** Yield and acceptability of machine separated minced flesh from some marine food fish. *J. Food Sci.* 55:972.
- Deng, J.C. 1981.** Effect of temperatures on fish alkaline protease, protein interaction and texture quality. *J. Food Sci.* 46:62-65.
- Deshpande, S.S. y Nielsen, S.S. 1987.** In vitro enzymatic hydrolysis of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Food Sci.* 52:1326-1329.
- Ehrhardt, N.M., Ramírez R.E.M., Arenas, F.P., Carranza, B.A., De la Garza, M.C. Jacquemin, P.P., Prado de S.P. y Solis, N.A. 1980.** Evaluación de los recursos demersales accesibles a redes de fondo en el Golfo de California (Mar de Cortes), México, durante 1979. Programa de Investigación y Desarrollo Pesquero Integrado México/PNUD/FAO. México.
- Erickson, M.C. Gordon, D.T. y Anglemier, A.F. 1983.** Proteolytic activity in the sarcoplasmic fluids of parasited Pacific whiting (*merluccius productus*) and unparasited true cod (*Gadus macrocephalus*). *J. Food Sci.* 48:1315-1319.
- Eriksen, S. y Fagerson, I.S. 1976.** The plastein reaction and its applications: a review. Removal of the bitterness from enzymatic hydrolysis of soybean and casein. *J. Food Sci.* 41:490-493.

- Esquerria, B.J.M., Velázquez, S.C., Yañez, F.G.A. y Barrón, H.J.M. 1990**
Diagnóstico del Sector Pesca en la Región Noroeste de la República Mexicana. *Rev. de Ciencias Alim.* 2(1):15-20.
- Fehér, F.M.J. y Halász, A. 1989.** Investigation of functional properties of partially hidrolized proteins. *Die Nahrung.* 33(1):9-15.
- Ferreira, M., Behringer, R. y Jost, R. 1995.** Instrumental method for characterizing protein foams. *J. Food Sci.* 60:1995.
- Fligner, K.L. y Mangino. 1991.** Relationship of composition to protein functionality. En "Interactions of Food Proteins". Parris, N. and Barfor R, (Eds). ACS Symposium series 454. American Chemical Society. Washington, D.C. Cap. 1. pp. 1-12.
- Frokjaer, S. 1994.** Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol.* 10:86-88.
- Fujimaki, M., Yamashita, M., Arai, S. y Kato, H. 1970.** Plastein reaction its application to debittering of proteolyzates. *Agric. Biol. Chem.* 34:483-484.
- Garcia-Chacon, E.J. Satterlee, L.D. y Hanna, M.A. 1990** Heat inducen gels from partially hidrolized soy protein isolate. *J. Food Biochem.* 14:15.
- Gauthier, S.F., Paquin, P., Pouliot, Y. y Turgeon, S. 1993** Surface Activity and Related Functional Properties of Peptides Obtained from Whey Proteins. *J. Dairy Sci.* 76: 321-328

- Giese, J. 1994.** Proteins as ingredients: Types, functions, applications. *Food Technol.* 10:50-60
- Gildberg, A. Batista, I. y Strom, E. 1989.** Preparation and characterization of peptones obtained by a two-step enzymatic hydrolysis of whole fish. *Biotechnol. and Applied Biochem.* 11: 413-423.
- Gildberg, A. 1993.** Enzymic Processing of Marine Raw Materials. *Process Biochem.* 28(1):1-15.
- Graham, D.E, y Phillips, M.C. 1976.** The conformation of proteins at the air-water interface in the role in stabilizing foams. En "Foams", Ed. Akers, R.J. p. 23. Academic Press, London.
- Gusek, T.W. y Kinsella, J.E. 1988.** Properties and potential applications of a unique heat-stable protease. *Food Technol.* 42(1):102.
- Haard, N.F. 1990.** Enzymes from food myosystems. *J. Muscle Foods.* 1:293-338.
- Haard N.F. 1992a.** A Review of Proteolytic Enzymes from Marine Organisms and Their Application in the Food Industry. *Journal of Aquatic Food Product Technol.* 1(1):17.
- Haard, N.F. 1992b.** Protein hydrolysis in seafoods. En "Seafoods: Chemistry, processing technology and quality. p. 10-33 Eds. Shahidi, F. y Botta, J.R. Blackie Academic & Professional of Chapman & Hall. London.

Haard, N.F. 1993. Enzyme technology in the Aquatic Foods industry. Class Notes. University of Davis, California.

Haard, N.F. 1995. Enzymes as food processing aids. Proceedings of Yenching International Symposium 94: Critical Issues in the Food Industry in the Nineties. Beijing, China. In press.

Haard, N.F. y Simpson, B.K. 1994. Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry. En "Fisheries Processing: Biotechnological applications. Ed. Martin, A.M. Chapman & Hall. London.

Hale, M.B. 1969. Relative activities of commercially-available enzymes in the hydrolysis of fish protein. Food Technol. 23:107.

Halling, P.J. 1981. Protein-stabilized foams and emulsions. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, CRC. 10:155-203.

Hamman, D.D., Amato, P.M., Wu, M.C. y Foegeding, E.A. 1990. Inhibition of modori (gel weakening) in surimi by plasma hydrolysate and egg white. J. Food Sci. 55:665-669, 795.

Hamm, R. 1986. Functional properties of the myofibrillar system and their measurements. En "Muscle as food: Food sci. & technol. A series of monographs". p. 135. Ed. Bechtel, P.J. Academic Press Inc. USA.

Hartnett, E.K. y Satterlee, L.D. 1990. The formation of heat and enzyme induced (plastein) gels from pepsin-hydrolyzed soy protein isolate. J. Food Biochem. 14: 1-13.

- Hoyle, N.T. y Merritt, J.H. 1994.** Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *J. Food Sci.* 59:76-80.
- Huber, D.G. y Regenstein, J.M. 1988.** Emulsion stability studies of myosin and exhaustively washed muscle from adult chicken breast muscle. *J. Food Sci.* 53:1282-1286, 1293.
- Inada, T. 1981.** Studies on the Merlucciid Fishes. *Bull. Far Seas Fish. Res. Lab.* 18:1-172.
- Iturbe-Chias, F.A. y López-Munguía, C.A. 1986.** Protolytic enzymes from *Cnidoscopus chayamansa* "Chaya". *J. Food Sci.* 51: 243.
- Jiang, S.T., Tsao, C.Y., Wang, Y.T. y Chen, C.S. 1990.** Purification and characterization of proteases from Milkfish muscle (*Chano chanos*). *J. Agric. Food Chem.* 38: 1458-1463.
- Kabata, Z. y Whitaker, D. 1981.** Two species of Kudoua (myxosporea: Multivalvulida) parasitic in the flesh of *Merluccius productus* (Ayres, 1855) (Pisces: Teleostei) in the Canadian Pacific. *Can. J. Zool.* 59:2085-2091.
- Karmas, E. y Lauber, E. 1987.** Novel products from underutilized fish using combined processing technology. *J. Food Sci.* 52:7.
- Kato, A. Takahashi, A. Matsudomi, N. y Kobayashi, K. 1983.** Determination of foaming properties of proteins by conductivity measurements. *J. Food Sci.* 48:62-65.

- Kato, A. Shimokawa, K. y Kobayashi, K. 1991.** Improvement of the unfunctional properties of insoluble gluten by pronase digestion followed by dextran conjugation. *J. Agric. Food Chem.* 39:1053-1056.
- Kato, A. 1991.** Significance of macromolecular interaction and stability in functional properties of food proteins. En *Interactions of Food Proteins*. Parris, N. and Barfor R, (Eds). ACS Symposium series 454. American Chemical Society. Washington, D.C. Cap. 2. p. 13-24.
- Kim, S.Y., Park, P.S.W. y Rhee, K.C. 1990.** Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* 38:651-656.
- Kinsella, J.E. 1976.** Funtional properties of proteins in foods: A survey. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 7:219-269.
- Kono, K. y Fukazawa, C. 1993.** Autolysis of squid mantle muscle protein as affected by storage conditions and inhibitors. *J. Food Sci.* 58:1198-1202.
- Koury, B., Spinelli, J. y Wieg, D. 1971.** Protein autolysys rates at various pH's and temperatures in hake, *Merluccius productus*, and Pacific herring, *Clupea barengus pallasi*, and their effect on yield in the preparation of fish protein concentrate. *Fish Bull.* 69:241-246.
- Kudo, G., Barnett, H.J. y Nelson R.W. 1987.** Factors affecting cooked quality of Pacific whiting, *Merluccius productus*, fillets with particular emphasis on the effects of infection by the *myxosporeans* *Kudoa paniformis* and *K. thyrisitidis*. *Fish. Bull.* 85:745-756.

- Kuehler, C.A. y Stine, C.M. 1974.** Effect of enzymatic hydrolysis on some functional properties of whey protein. *J. Food Sci.* 39:379-382.
- Ledward, D.A. y Lawrie, R.A. 1984.** Recovery and utilization of by-product proteins of the meat industry. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 34b:223-228.
- Lee, S.W., Shimizu, M., Kaminokawa, S. y Yamauchi, K. 1987a** Emulsifying properties of peptides obtained from the hydrolyzates of B-casein. *Agric. Biol. Chem.* 51:161-166.
- Lee, S.W., Shimizu, M., Kaminokawa, S. y Yamauchi, K. 1987b.** Emulsifying properties of a mixture of peptides derived from the enzymatic hydrolyzates of bovine caseins. *Agric. Biol. Chem.* 51:1535-1540.
- Leiras, M.C. Chirife, J. y Alzamora, S.M. 1991.** Development of a shelf-stable hydrolyzed concentrated cheese whey. *J. Food Sci. Technol.* 24:12-16.
- Li-Chan, E. Nakai, S. y Wood. 1984.** Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties. *J. Food Sci.* 49:345-350.
- Liu, L.L. y Pigott, G.M. 1981.** Preparation and use of expensive crude pepsin for enzyme hydrolysis of fish. *J. Food Sci.* 46:1569-1572.
- Löffler, A. 1986.** Proteolytic Enzymes: Sources and Applications. *Food Technol.* 40(1):63.

López-Bajonero, L.J., Lara-Calderon, P., Galvez-Mariscal, A., Velazques-Arellano, A. y Lopez-Munguia, A. 1991. Enzymatic production of a low-phenylalanine product from skim milk powder and caseinate. *J. Food Sci.* 56: 938-942.

López-Vizcarra, R.H. 1995. Determinación de los pesos moleculares de hidrolizados de músculo de merluza del Pacífico por electroforesis capilar. Tesis de Licenciatura en preparación.

Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, L.A. y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.

Lugo-Sánchez, M.E., Pacheco-Aguilar, R. y Yépez-Plascencia, G.M. 1995. Partial characterization of the proteinase activity in sarcoplasmic fluid of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) muscle. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. En prensa.

Mahmoud, M.I., Malone, W.T. y Cordle, C.T. 1992. Enzymatic Hydrolysis of Casein - Effect of Degree of Hydrolysis on Antigenicity and Physical Properties. *J. Food Sci.* 57: 1223-1229.

Mahmoud, M.I. 1994. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol.* 48(10):89-95.

McIver, R.C., Brooks, R.I. y Reineccius, G.A. 1982. Flavor of fermented fish sauce. *J. Agric. Food Chem.* 30:1017-1020.

- Marinou, D.A., Co, Y.C.L y Livingston, G.E. 1974.** Evaluation of fish protein concentrate as a replacement for dry skim milk in laubina weaning food mixtures. *J. Food Sci.* 39: 883-886.
- Martinez, A. y Gildberg, A. 1988.** Autolytic degradation of belly tissue in anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *International J. Food Sci. Technol.* 23: 185-195.
- Mazorra Manzano, M.A. y Ramírez Suárez, J.C. 1991.** Evaluación de procesos de lavado para optimizar la producción desurimi de sardina Monterrey (*Sardinops sagax caerulea*). Tesis Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora. Mexico.
- Monti, J.C. y Jost, R. 1978.** Enzymatic solubilization of heat-denatured cheese whey protein. *J. Dairy Sci.* 61:1233-1237.
- Morrissey, M.T., Wu, J.W., Lin, D. y An, H. 1993.** Effect of protease inhibitors on torsion measurements and autolysis of Pacific whiting surimi. *J. Food Sci.* 58:1050-1054.
- Nakajima, M., Shoji, T. y Nabetani, H. 1992.** Protease hydrolysis of water soluble fish proteins using a free enzyme membrane reactor. *Process Biochem.* 27:155-160.
- Nakai, S., Li-chan, E., Hirotsuka, M., Vazquez, M.C. y Arteaga, G. 1991.** Quantitation of hydrofobicity for elucidating the structure-activity relationships of food proteins. En *Interactions of Food Proteins*. Parris, N. and Barfor R, (Eds). ACS Symposium series 454. American Chemical Society. Washington, D.C. Cap. 4. pp. 42-58.

- Ney, K.H. 1979.** Taste of potato protein and its derivatives. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56:295-297.
- Nijpels, H.H., Evers, P.A., Novak, G. y Ramet, J.P. 1980** Application of cryoscopy for the measurement of enzymatic hydrolysis of lactose. *J. Food Sci.* 45:1684-1687.
- Novo Industri A/S. 1978.** Hydrolysis of food proteins in the laboratory. boletin No. 102e-GB. Bagsvaerd, Denmark.
- Novo Ondustri A/S. 1986.** Novo's handbook of practical biotechnology. Ed. Boyce, C.O.L. Bagsvaerd, Denmark.
- Olsen, H.S. y Adler-Nissen, J. 1979.** Industrial production and aplications of a soluble enzymatic hydrolyzate of soya protein. *J. Process Biochem.* 7:6-11.
- Pacheco-Aguilar, R. 1990.** Effect of potassium bromate in the gel forming ability of Pacific whiting (*Merluccius products*). Tesis de Doctorado. Oregon State University. Corvallis, Oregon.
- Pacheco-Aguilar, R., Crawford, D.L. y Lampila, L.E. 1989.** Procedures for the efficient washing of minced whiting (*Merluccius productus*) flesh for surimi production. *J. Food Sci.* 54:248.
- Parrado, J., Bautista, J. y Machado, A. 1991.** Production of soluble enzymatic protein hydrolysate from industrially defatted nondehulled sunflower meal. *J. Agric. Food Chem.* 39:447-450.

- Parris, N., Woychik, J.H. y Cooke, P. 1991.** Effect of preheat temperature on the hydrophobic properties of milk proteins. En Interactions of Food Proteins. Parris, N. and Barfor R, (Eds). ACS Symposium series 454. American Chemical Society. Washington, D.C. Cap. 3. pp. 25-41.
- Patashnik, M., Groninger, H.S.Jr., Barnett, H., Kudo, G. y Koury, B. 1982.** Pacific whiting, *Merluccius productus*: 1. Abnormal muscle texture caused by myxosporidian-induced proteolysis. Mar. Fish. Rev. 44(5):1-12.
- Pearce, K.N y Kinsella, J.E. 1978.** Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. J. Agric. Food Chem. 26:716-723.
- Pedersen, B. 1994.** Removing bitterness from protein hydrolysates. Food Technol. 10:96-98, 76.
- Perkins, C. 1992.** The advanced seafood handbook. Published by Seafood Business Magazine.
- Phillips, L.G., Shulman, W. y Kinsella, J.E. 1990.** pH and heat treatments effects on foaming of whey protein isolate. J.Food Sci. 55:1116-1119.
- Powrie, W.D. y Tung, M.A. 1976.** Food Dispersions. p. 539-575. En "Principles in food science". Part 1: Food chemistry. Ed. Fennema, O.R. Marcel Dekker, Inc. USA.
- Quaglia, G.B. y Orban, E. 1987.** Enzimic solubilisation of proteins of sardine (*Sardina pilchardus*) by comercial proteases. J. Sci. Food Agric. 38:263.

- Quaglia, G.B. y Orban, E. 1990.** Influence of Enzymatic hydrolysis on protein hydrolysates. *J. Food Sci.* 55: 1571-1573, 1619.
- Raghunath, M.R. y McCurdy, A.R. 1991.** Synthesis of plasteins from fish silage. *J. Sci. Food Agric.* 54:655-658.
- Rha, C. y Pradipasena, P. 1986.** Viscosity of proteins. p. 79-120. En "Funtional Properties of Food Macromolecules". Eds. Mitchell, J.R. y Ledward, D.A. Elsevier Applied Science Publiser, LTD.
- Rha, C. y Pradipasena, P. 1986.** Viscosity of proteins. p. 79-120. En "Funtional Properties of Food Macromolecules". Eds. Mitchell, J.R. y Ledward, D.A. Elsevier Applied Science Publiser, LTD.
- Romero, J. y Ryan, D.S. 1978.** Susceptibility of the major storage protein of the bean, *Phaseolus vulgaris L.*, to in vitro enzymatic hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* 26 784-788.
- Sathe, S.K y Salunkhe, D.K. 1981.** Functional properties of the great northern bean (*Phaseolus vulgaris L.*) proteins: Emulsion, foaming, viscosity and gelation properties. *J. Food Sci.* 46:71-74, 81.
- Satterlee, L.D., Zachariah, N.Y. y Levin, E. 1973.** Utilization of beef and pork skin hydrolyzates as a binder or extender in sausage emulsions. *J. Food Sci.* 38:268-270.
- Satterlee, L.D. 1981.** Proteins for use in foods. *Food Technol.* 6:53-70.

- Schmidl, M.K., Taylor, S.L. y Nordlee, J.A. 1994.** Use of hydrolysate-based products in special medical diets. *Food Technol.* 10:77-80, 85.
- Schut, J. 1976.** Meat emulsions. En "Food emulsions". Vol. 5. p. 385. Ed. Friberg, S. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Sekul, A.A. y Ory, R.L. 1977.** Rapid enzymatic method for partial hydrolysis of oilseed proteins for food uses. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 54(1):32-35.
- Sen, D.P., Sripathy, N.V., Lahiry, N.L., Sreenivasan, A. y Subrahmanyam, V. 1962.** Fish Hydrolysates. I. Rate of hydrolysis of fish flesh with papain. *Food Technol.* 5: 138-141.
- Sepesca. 1995.** Secretaria de Pesca. Sistemas Descentralizados de Información Pesquera. Hermosillo, Sonora. Mexico.
- Seymour, T.A., Morrissey, M.T. Peters, M. Y. y An, H. 1994.** Purification and characterization of Pacific whiting proteases. *J. Agric. Food Chem.* 42:2421-2427.
- Shahidi, F., Synowiecki, J. y Balejko, J. 1994.** Proteolytic hydrolysis of muscle proteins of harp seal (*phoca groenlandica*). *J. Agric. Food Chem.* 42:2634-2638.
- Shimizu, M., Lee, S.W., Kaminogawa, S. y Yamauchi, K. 1986.**
Functional properties of a peptide of 23 residues purified from peptic hydrolyzate of α s1-CASEIN: Changes in the emulsifying activity during purification of the peptide. *J. Food Sci.* 51:1248.

- Sikorski, Z.E. y Naczek, M. 1981.** Modification of technological properties of fish protein concentrates. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* 4:201-230.
- Simidu, W. 1961.** Nonprotein nitrogenous compounds. En "Fish as Food". Vol I. p. 353. Ed. Borgstrom, G. Academic Press. Orlando Fla. London.
- Smith, D.M. y Brekke, C.J. 1984.** Functional properties of enzymatically modified beef heart protein. *J. Food Sci.* 49:1525-1528.
- Splitter, J.L. y Shipe, W.F. 1976.** Enzymatic hydrolysis and vole bioassay for estimation of the nutritive quality of maize. *J. Food Sci.* 41:387-391.
- Sripathy, N. V., Sen, D.P., Lahiry, N.L., Sreenivasan, A. y Subrahmanyam, V. 1962.** Fish hydrolysates. II. Standardization of digestion condition for preparation of hydrolyzates rich in peptones and proteoses. *Food Technology.* 5(1):141-142.
- Stefansson, G. 1988.** Enzymes in the Fishing Industry. *Food Technol.* 42(3):64.
- Su, H., Lin, T.S y Lanier, T.C. 1981.** Contribution of retained organ tissues to the alkaline protease content of mechanically separated Atlantic croaker (*Micropogon undulatus*). *J. Food Sci.* 46:1650-1653.
- Sugimoto, H., Van Buren, J.P. y Robinson, W.B. 1971.** An enzymatic process for a protein-containing beverage based on soybean protein and lemon juice. *J. Food Sci.* 36:729-731.
- Suzuki, T. 1981.** Fish and Krill Protein: Processing Technology. Applied Sci. Publishers LTD., London.

- Tarky, W., Agarwala, O.P. y Pigott, G.M. 1973.** Protein hydrolysate from fish waste. *J. Food Sci.* 38: 917-918.
- Tilgner, D.J. 1990.** Preface. En "Seafood: Resources, Nutritional Composition, and Preservation". p. 2. Ed. Sikorski, Z.E. CRC Press, Inc. USA.
- Tood, W. G. y Kinsella, J.E. 1988.** Properties and Potential Applications of a Unique Heat-Stable Protease. *Food Technol.* 42(1):102.
- Toole, C. 1985.** Which underutilized species and by-products have realistic profit potential?. En "Underutilized Species and Seafood By-Products". p. 9. Eds. Yuska, J. y Ridlington, S. Oregon Sea grant. Oregon State University. USA.
- Tsuyuki, H., Willisicroft, S.N., Kabata, Z. y Whitaker.1982.** The relationship between acid and neutral protease activities and the incidence of soft cooked texture in the muscle tissue of Pacific hake *Merluccius products* infected with *Kudoa paniformis* and/or *K. thyrissilis*, and held for varying times under diferent pre-freeze chilled storage conditions. Fisheries and Aquatic Sciences Canadian Technical Report. No. 1130.
- Turgeon, S.T. y Gauthier, S.F. 1990.** Whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process: Production and characterization. *J. Food Sci.* 55:106-110, 157.
- Turgeon, S.L., Bard, C. y Gauthier, S.F. 1991.** Comparaison de trois méthodes pour la mesure du degré d'hydrolyse de protéines laitières modifiées enzymatiquement. *J. Can. Inst. Sci. Technol.* 24(1/2):14-18.

- Turgeon, S.L. Gauthier, S.F. y Paquin, P. 1992** Emulsifying property of whey peptide fractions as a function of pH and ionic strength. *J. Food Sci.* 57:601-604, 634.
- Vallejo-Cordoba, B., Nakai, S., Powrie, W.D. y Beveridge, T. 1986.** Protein hydrolysates for reducing water activity in meat products. *J. Food Sci.* 51:1156-1161.
- Voutsinas, L.P., Cheung, E. y Nakai, S. 1983.** Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. *J. Food Sci.* 48:26-32.
- Waniska, R.D. y Kinsella, J.E. 1979.** Foaming properties of proteins: Evaluation of a column aeration apparatus using ovalbumin. *J. Food Sci.* 44:1398-1411.
- Wasson, D.H. 1992.** Fish muscle proteases and heat-induced myofibrillar degradation: A review. *J. of Aquatic Food Product Technology.* 1(2):23-41.
- Whitaker, J.R. 1994.** Principles of enzymology for the food sciences. 2nd Edition. Marcel Dekker, Inc. USA.
- Webb, N.B., Ivey, F.J., Craig, H.B., Jones, V.A. y Monroe, J. 1970** The measurement of emulsifying capacity by electrical resistance. *J. Food Sci.* 35:501-504.
- Woyewoda, A.D., Shaw, S.J., Ke, P.J. y Burns, B.G. 1986** Recommended methods for assesment of fish quality. Canadia Technical Report of

Fisheries and Aquatic Sciences, No. 1448. Department of Fisheries and Oceans. Halifax, Nova Scotia, Canada.

Wray, T. 1988. Fish processing: New uses for enzymes. *Food Manufacture*. 63(7):48.

Xiong, Y.L. 1994. Miofibrillar protein from different muscle fiber types: Implications of biochemical and functional properties in meat processing. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 34(3):293-320.

Yamashita, M., Arai, S., Tsai, S.J. y Fujimaki, M. 1970. Supplementing S-containing amino acids by plastein reaction. *Agr. Biol. Chem.* 34:1593-1596.

Yañez, E., Ballester, D. y Monckeberg, F. 1976. Enzymatic fish protein hydrolyzate: chemical composition, nutritive value and use as a suplement to cereal protein. *J. Food Sci.* 41:1289-1292.

Yu, M.A. y Damodaran, S. 1991a. Kinetics of protein foam destabilization: Evaluation of a method using bovine serum albumin. *J. Agric. Food Chem.* 39:1555-1562.

Yu, M.A. y Damodaran, S. 1991b. Kinetics of Destabilization of soy protein foams. *J. Agric. Food Chem.* 39:1563-1567.

Zhu, H. y Damodaran, S. 1994. Heat-induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties. *J. Agric. Food Chem.* 42:846-855.

