



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

“Mejoramiento de evaluación sensorial de concentrados proteicos de co-productos de la industria salmonicultora chilena, por medio de la optimización de los parámetros involucrados en el proceso de hidrólisis enzimática.”

NICOLÁS PALOU MELLADO

Profesor Patrocinante:

María Antonieta Valenzuela

Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad Ciencias Químicas y
Farmacéuticas, Universidad de Chile

Directores de Memoria:

María Antonieta Valenzuela

Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad Ciencias Químicas y
Farmacéuticas, Universidad de Chile

Rodrigo González M.

Laboratorio de Biomoléculas
Fundación Chile.

Santiago Chile

2011

AGRADECIMIENTOS

Todos mis agradecimientos a:

Mi familia, Alejandra, Jesús, María Jesús y Alejandro que siempre supieron que iba a sacar todo adelante, en especial a mi mamá que se preocupó durante todos mis años escolares y universitarios de que estuviera bien y tranquilo. A mis abuelos quienes siempre se preocuparon por mis estudios y por mi tranquilidad y comodidad. A mi polola Catalina, que siempre me apoyó en todos los momentos difíciles y los gratos de mi vida universitaria. A los profesores que me acompañaron durante mi carrera, en especial a la profesora Jenny, quien me acogió durante mucho tiempo en su laboratorio con buena disposición.

Agradezco también a Fundación Chile que me abrió las puertas para realizar esta tesis, a Rodrigo, Cristian, Marcelo, Jorge, Alejandro y Daygoro, quienes fueron los más cercanos en mi estadía en la fundación. A la gente del área de recursos marinos por estar siempre con buena disposición y abiertos a solucionar los problemas.

Por último también agradezco a las personas que siempre han estado ahí y han ayudado de una manera más silenciosa, simplemente con una sonrisa o con su buena voluntad.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE GENERAL	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE ANEXOS	vi
NOMENCLATURA	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hidrolizados proteicos	4
1.2. Enzimas	6
1.2.1. Enzimas Endógenas	6
1.2.2. Enzimas Exógenas	6
1.3. Enzimas Exógenas	8
1.4. Uso de antioxidantes en la hidrólisis	9
1.4.1. Antioxidantes	12
1.4.1.1. BHA y BHT	12
1.4.1.2. TBHQ	12
1.4.1.3. PG	12
1.4.1.4. Extractos de romero (Herbalox)	13
1.5. Hipótesis	14
1.5.1. Objetivo General	14
1.5.2. Objetivos Específicos	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.1. Materiales	15
2.1.1. Materia prima	15
2.1.2. Enzimas	15
2.1.3. Antioxidantes	16
2.1.4. Reactivos químicos	16
2.2. Métodos	17
2.2.1. Hidrólisis enzimática de proteínas	17
2.2.2. Concentrado y secado de muestras	18
2.2.3. Medición del porcentaje de grados de Hidrólisis (%GH)	18
2.2.4. Determinación de índice de peróxidos en aceite de pescado	19

2.2.5. Medición de la concentración de proteínas por método de Biuret	20
2.2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida	21
2.2.7. Grados Brix	21
2.2.8. Evaluación Sensorial	22
2.2.9. Análisis estadístico	22
3. RESULTADOS	23
3.1. Diseño experimental	23
3.2. Análisis proximal de la materia prima	24
3.3. Hidrólisis Enzimática	25
3.4. Grado de hidrólisis	26
3.4.1. Grado de hidrólisis con Alcalasa como enzima	27
3.3.2. Grado de hidrólisis con Protamex como enzima	28
3.4.3. Grado de hidrólisis con Corolasa como enzima	29
3.5. Índice de peróxidos en el aceite	29
3.6. Proteínas	30
3.6.1. Proteínas de la fase soluble	31
3.6.2. Proteínas del Hidrolizado Proteico (seco)	32
3.6.3. Rendimiento del proceso	33
3.7. Curvas de hidrólisis	34
3.8. Grados Brix	36
3.9. Evaluación sensorial	37
3.10. Electroforesis en gel de poliacrilamida	39
4. DISCUSIÓN	40
4.1. Grado de hidrólisis	40
4.2. Índice de Peróxidos	41
4.3. Proteínas	42
4.4. Curvas de hidrólisis y grados Brix	44
4.5. Evaluación sensorial	45
4.5.1. Evaluación sensorial y porcentaje de hidrólisis	46
4.5.2. Evaluación sensorial y Enzimas	46
4.5.3. Evaluación sensorial y oxidación de lípidos	47
5. CONCLUSIONES	49
6. BIBLIOGRAFÍA	50
7. ANEXOS	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Características principales de las enzimas	15
Tabla 2	Diseño experimental de los procesos de hidrólisis detallados para Alcalasa	23
Tabla 3	Diseño experimental de los procesos de hidrólisis detallados para Protamex	23
Tabla 4	Diseño experimental de los procesos de hidrólisis detallados para Corolasa	24
Tabla 5	Valores obtenido del análisis proximal de la materia prima	24
Tabla 6	Diferentes fracciones obtenidas en los procesos de hidrólisis con Alcalasa	25
Tabla 7	Diferentes fracciones obtenidas en los procesos de hidrólisis con Protamex	25
Tabla 8	Diferentes fracciones obtenidas en los procesos de hidrólisis con Corolasa	25
Tabla 9	Promedios de oxidación lipídica para cada antioxidante en el tiempo	29
Tabla 10	Contenido de proteína en las muestras de fase soluble de cada proceso de hidrólisis	31
Tabla 11	Contenido de proteína en las muestras de hidrolizado proteico de cada proceso	32
Tabla 12	Hidrólisis con Alcalasa a diferentes tiempos	35
Tabla 13	Hidrólisis con Protamex a diferentes tiempos	35
Tabla 14	Hidrólisis con Corolasa a diferentes tiempos	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Porcentaje de participación de las exportaciones de salmónidos, del año 2009	2
Figura 2	Rompimiento enzimático de enlaces peptídicos	3
Figura 3	Clasificación de proteasas según el lugar de corte	7
Figura 4	Hidrólisis realizada con una mezcla de diferentes proteasas	9
Figura 5	Proceso de oxidación lipídica	10
Figura 6	Diagrama de bloques del proceso	18
Figura 7	Resultados del promedio del porcentaje de hidrólisis para cada enzima	26
Figura 8	Resultados del promedio del porcentaje de hidrólisis para cada antioxidante usado en el proceso	27
Figura 9	Resultados del porcentaje de hidrólisis obtenido por cada antioxidante en el proceso de hidrólisis con Alcalasa	27
Figura 10	Resultados del porcentaje de hidrólisis obtenido por cada antioxidante en el proceso de hidrólisis con Protamex	28
Figura 11	Resultados del porcentaje de hidrólisis obtenido por cada antioxidante en el proceso de hidrólisis con Corolasa	29
Figura 12	Oxidación lipídica para cada antioxidante en el tiempo	30
Figura 13	Contenido de proteína promedio en la fase soluble de cada proceso obtenido con cada enzima	31
Figura 14	Porcentaje de proteínas presentes en el hidrolizado proteico obtenido con cada enzima	33
Figura 15	Rendimiento promedio de la recuperación de proteínas desde la materia prima	33
Figura 16	Diferentes fases obtenidas luego de la centrifugación	34
Figura 17	Curvas del porcentaje de hidrólisis para cada enzima a diferentes tiempos	36
Figura 18	Cambio de los °Brix en el tiempo de hidrólisis	37
Figura 19	Curva de calibración proteínas versus °Brix para un hidrolizado proteico realizado con Corolasa	37
Figura 20	Evaluación sensorial de los hidrolizados proteicos	38
Figura 21	Influencia de los antioxidantes en la evaluación sensorial de los hidrolizados proteicos	39

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Perfiles aminoacídicos de los hidrolizados proteicos	52
Anexo 2	Fotografías de los hidrolizados proteicos	53
Anexo 3	Materia prima	54

NOMENCLATURA

MP:	Materia prima
FPH:	Hidrolizado de proteínas de pescado
Prot:	Proteínas
s/w:	Relación sustrato agua
AL:	Alcalasa 2,4L
PT:	Protamex
CO:	Corolasa L-10
%GH:	Porcentaje de grado de hidrólisis
PV:	Valores de peróxido
TBHQ:	Terbutilhidroquinona
BHA:	Butilhidroxibutilanisol
BHT:	Butilhidroxitolueno
PG:	Butilhidroxibutilanisol
SA:	Sin antioxidante
TBE:	Mezcla de TBHQ/BHT/EDTA (Relación 2:1:0,5)
Hx:	Herbalox
Px:	Pet-Ox RC
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
PV:	índice de peróxido
BSA:	Albúmina de suero de bovino
IFOP:	Instituto de Fomento Pesquero
PUFA:	Ácidos grasos poli-insaturados
EPA:	Ácido eicosapentaenoico
DHA:	Ácido eicosapentaenoico
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
(O₂⁻):	Radical superóxido
(OH[·]):	Radical hidroxilo
(H₂O₂):	Peróxido de hidrogeno
(¹O₂):	Oxígeno singulete
T°:	Temperatura

RESUMEN

La industria pesquera y acuícola mundial genera enormes cantidades de subproductos ricos en proteínas que son sub aprovechados año a año sin ningún intento de darle un buen uso a estas materias primas. La recuperación y la alteración de las proteínas presente en los subproductos de la industria acuícola pesquera y el uso de éstas como ingredientes funcionales en sistemas alimentarios, es una alternativa muy interesante, y que al día de hoy presenta resultados muy promisorios, en especial para la industria procesadora de subproductos.

Se han estudiado diferentes estrategias para recuperar la proteína de los subproductos de la industria acuícola pesquera; como por ejemplo los hidrolizados de proteínas de pescado (FPH). La esencia de la hidrólisis proteica es la ruptura del enlace peptídico, y en consecuencia, la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres. La ruptura de estos enlaces puede producirse por métodos químicos o biológicos.

La hidrólisis biológica, para producir FPH es por medio de la utilización de enzimas para hidrolizar los enlaces peptídicos; ésta acción puede ser realizada por enzimas proteolíticas. Entre los principales problemas de la preparación de los FPH, está la susceptibilidad extrema de sus grasas a oxidación. Este proceso de oxidación en los alimentos causa una secuencia de cambios desfavorables, principalmente, el deterioro de las propiedades sensoriales del producto.

La prevención de la oxidación lipídica es de gran importancia del punto de vista de la salud, y en el ámbito económico, por lo tanto, existen grandes esfuerzos para controlar este proceso. Debido a esto se utilizan las llamadas moléculas antioxidantes, que son moléculas orgánicas, ya sean sintéticas o naturales, las cuales pueden retardar o evitar el proceso de rancidez oxidativa.

Por lo mencionado anteriormente es importante estudiar el proceso de recuperación de proteínas de subproductos de la industria salmonicultora chilena. Dando un énfasis en las características organolépticas del producto obtenido, para ellos se van a realizar diferentes ensayos con distintas variables involucradas en el proceso, como por ejemplo, lo son las enzimas usadas para la proteólisis de las proteínas y los antioxidantes usados para el adecuado cuidado de los aceites contra la oxidación.

La forma de recuperación de estas proteínas fue realizado a través del proceso de hidrólisis enzimática, el cual es un procesos que presenta amplias ventajas sobre la hidrólisis química y otros métodos de recuperación de proteínas.

Los métodos usados para analizar los diferentes procesos fueron: medición del porcentaje de grado de hidrólisis (%GH), parámetro fundamental en el proceso de hidrólisis enzimática; medición del índice de peróxido (PV), método que sirve para analizar el nivel de oxidación de los aceites, cantidad de proteína presente en cada proceso y evaluación sensorial de cada proceso realizado, entre otros.

Dentro de los resultados obtenidos se puede concluir que hay diferencias entre las enzimas elegidas para realizar la hidrólisis, ya que estas exhiben diferentes %GH además de producir hidrolizados con diferentes características organolépticas y entre los distintos antioxidantes estudiados para la protección de los aceites en el proceso de hidrólisis, los cuales presentan PV muy diferentes entre si, junto con tener diferencias en las características organolépticas de los hidrolizados.

La enzima que produjo un mayor %GH fue Protamex seguido de Alcalasa y Corolasa, pero en el caso de las características organolépticas Corolasa es presentó la que mayor aceptabilidad, esto es debido a que produce hidrolizados con sabor menos amargo. Para el caso de los antioxidantes, la mezcla de TBHQ/BHT/EDTA (TBE) es la que mejor cumplió la función de protección de los aceites, dando PV menores en comparación con los otros antioxidantes estudiados Herbalox (Hx), Pet-Ox Rc (Px) y sin antioxidante (SA). En el caso de las características organolépticas, el proceso SA fue mas aceptado seguido del proceso TBE, Hx y Px, lo cual indica que la adición del antioxidante puede afectar el sabor del hidrolizado.

Por último como conclusión se puede deducir que para obtener un producto con características organolépticas deseadas se debe hacer una elección del enfoque final del producto, es decir, si solamente se va a pensar en el hidrolizado proteico o también en los aceites obtenidos del proceso, teniendo eso en cuenta es posible elegir de mejor manera los parámetros (tipo de enzima, tipo de antioxidante y cantidad de antioxidante) involucrados en el procesos de hidrólisis enzimática.

“Improvement of the sensorial evaluation of protein concentrates of co-products from the Chilean salmon industry, through the optimization of the parameters involved in the enzymatic hydrolysis process”

The fishing and aquaculture world industry generates huge amounts of byproducts rich in proteins that year after year are dismissed without any intention of taking advantage of these raw materials. The recovery and modification of the proteins within these byproducts from the fishing and aquaculture industry and the use of them as functional ingredients in food systems is a very interesting alternative that nowadays shows very promising results, specially for the industry dedicated to process these byproducts.

Different strategies have been studied for the recovery of the proteins in the byproducts of the fishing and aquaculture industry; for example the fish hydrolyzed proteins (FHP). The core of the protein hydrolysis is the disruption of the peptide bond, as a consequence you can obtain a series of smaller peptides or even single amino acids. The disruption of this bond can be achieved by chemical or biological methods.

The biological hydrolysis to obtain FHP consists in the usage of enzymes to hydrolyze the peptide bonds; this action can be done by proteolytic enzymes. Among the main problems of the PFH preparation is the extreme susceptibility of the fatty acids to oxidation. This oxidation process causes a series of unwanted changes in the foods, especially in the sensorial properties of the product.

The prevention of the lipidic oxidation is a matter of high importance from a health and economical point of view, for this reason big efforts are being taken to control this process. Due to this, antioxidant molecules have been used, which are natural or synthetic organic molecules that can delay or avoid the process of oxidative decomposition.

Because of all the information previously mentioned it would be important to study the protein recovery process from the byproducts of the Chilean salmon industry. Focusing on the organoleptic characteristic of the product obtained, different assays will be performed managing different variables involved in the recovery process, as an example, the enzymes used for the protein proteolysis or the antioxidants used for the proper care of the oils against oxidation.

The protein recovery was performed through the enzymatic hydrolysis process, which presents ample advantages over chemical hydrolysis or other methods for protein recovery.

The methods to analyze the different processes were: measurement of the percentage of hydrolysis degree (%HD), fundamental parameter in the enzymatic hydrolysis process; measurement of the mili equivalents of hydrogen peroxide (HP), method used to analyze the oil oxidation level; measurement of the protein content on every process; and a sensorial evaluation of every process performed.

With the obtained results it can be concluded that there are differences between the enzymes used to carry out the hydrolysis, because they exhibit different %HD and also produce hydrolyzates with different organoleptic characteristics. Among the antioxidants used for the protection of the oils, there were big differences in the HP of the hydrolyzates and also in the organoleptic characteristics.

The enzyme with the highest %HD was Protamex, followed by Alcalase and Corolase respectively. But in the organoleptic characteristics, Corolase was the highest approval mainly because it produced hydrolyzates that were less bitter. In the case of the antioxidants, the mixture of TBHQ/BHT/EDTA (TBE) is the one that better fulfilled the function of protecting the oils, resulting in very low HP in comparison of the other antioxidants used, such as Herbalox (Hx), Pet-OX Rc (Px) and without antioxidant (WA). In the case of the organoleptic characteristics, the one with highest approval was WA followed by TBE, Hx and Px respectively, which indicates that the addition of an antioxidant can affect the flavor of the hydrolyzate.

Finally, it can be concluded that to obtain a product with the desired organoleptic characteristics an election must be done focused on the end product, it means, if only the protein hydrolyzate is wanted or if also the oils obtained in the process are required. Having this in consideration it is possible to optimally choose the parameters (type of enzyme, type of antioxidant, amount of antioxidant) involved in the process of enzymatic hydrolysis.

1. INTRODUCCIÓN

La industria pesquera y acuícola mundial genera enormes cantidades de subproductos ricos en proteínas, estos subproductos son sub aprovechados año a año sin ningún intento de darle un buen uso a sus proteínas, generando producto de bajo valor comercial y solo utilizados para alimentación animal (aceite y harina de pescado). Recientemente, en muchas localidades a nivel mundial el procesamiento de éstos, prohibió botar sus desperdicios (subproductos) directamente al mar, lo que resultó en altos costos de refinamiento del material antes de ser desechado. Es por esto que se desarrollaron nuevos usos alternativos para estos materiales y para la utilización correcta de esta fuente de proteínas, ya que con el aumento dramático de la población mundial y su necesidad de fuentes proteicas, junto con el daño de la pesca excesiva, se genera una gran necesidad de utilizar nuestros recursos marinos con más inteligencia y previsión (Kristinsson y Rasco, 2000a; Kristinsson y Rasco, 2000b).

En el marco de lo anterior es evidente la necesidad de dar un mejor aprovechamiento a los subproductos de la industria pesquera y acuícola, ya que nuestro país es un gran productor de alimentos de origen marino. La cantidad de exportaciones del sector acuícola pesquero de nuestro país, según datos del Instituto de Fomento Pesquero (IFOP) a diciembre del año 2009 alcanzaron a un total de 92 mil toneladas, por un valor (FOB) de 335 millones de dólares. En el período enero-diciembre 2009, la cantidad transada mostró un aumento de 5,9%, respecto a igual período del año anterior, siendo el cultivo de salmónidos muy importante por las grandes cantidades de ventas (Figura 1). El total de productos salmonídeos, exportados por el país en diciembre de 2009 alcanzó a 42.804 toneladas. En diciembre del mismo año (2009), el precio promedio FOB de las exportaciones de salmónidos, mostró un aumento de 7,5%, respecto al obtenido en igual fecha del año anterior, alcanzando a US\$5.393/ton (IFOP 2009).

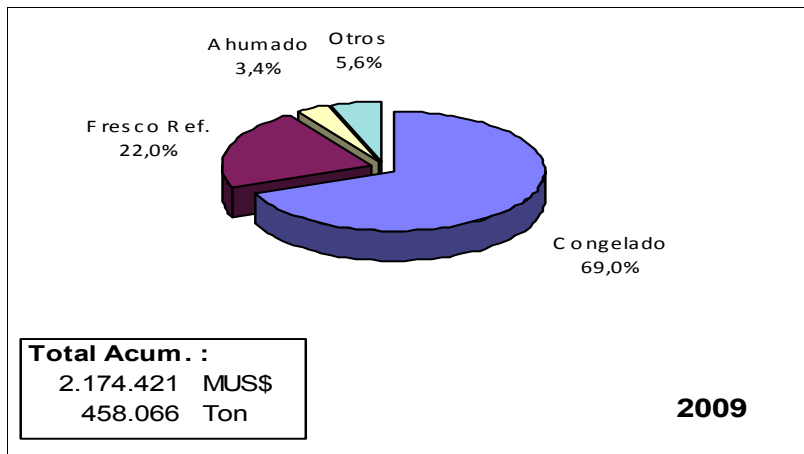


Figura 1. Porcentaje de participación de las exportaciones de salmónidos, en el año 2009 (IFOP 2009).

Las especies salmonídeas que se producen en Chile son trucha arcoíris, salmón *coho* y salmón atlántico. Se ha estipulado que en un proceso típico de fileteo, por cada 100 kilogramos de trucha Arcoíris, sólo se recuperan, aproximadamente, 40 kilogramos de filete sin piel y sin huesos, lo que lleva a 60 kilogramos de subproductos del procesamiento (Chen y Jaczynski, 2007). Con respecto a lo anterior, es importante dar un uso adecuado a la enorme cantidad de subproductos generados cada año en Chile, ya que sólo se da un adecuado manejo sanitario al filete generado, considerando a los demás productos generados como “subproductos”, y perdiendo la calidad de “co-productos” con adecuado manejo sanitario y de cadena de frío, como para ser materias primas aptas para generar productos de consumo humano.

Del procesamiento de las especies salmonídeas se generan distintos productos, los que pueden ser tratados por distintos métodos para generar tres fracciones principales: proteínas, lípidos y huesos. Dependiendo de los procesos y la calidad de las materias primas, cada una de estas fracciones podría ser utilizada para diferentes aplicaciones. Desde un punto de vista nutricional, la proteína de músculo de salmón tiene un buen balance en la composición aminoacídica, alta en los principales aminoácidos esenciales. Por otro lado el aceite de salmón es rico en ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (PUFAS, por su sigla en inglés), tales como ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), y la fracción de huesos podría ser una buena fuente de minerales para la dieta (Liaset et al., 2003), por dar algunos ejemplos básicos de aplicaciones.

La recuperación y la alteración de las proteínas presente en los co-productos de la industria acuícola pesquera y el uso de éstas como ingredientes funcionales en sistemas alimentarios, es una alternativa muy interesante. Al día de hoy presenta resultados muy promisorios, en especial para la industria procesadora de subproductos, ya que generar productos de alto valor agregado es económicamente factible, pensando en que hoy se producen productos (harina y aceite) de muy bajo valor comercial, en comparación con los hidrolizados protéicos, y que gran parte de estos subproductos son desechados (Kristinsson y Rasco, 2000b).

Se han estudiado diferentes estrategias para recuperar las proteínas de los subproductos de la industria acuícola pesquera; como por ejemplo los hidrolizados de proteínas de pescado (FPH por sus siglas en inglés). Estos se obtienen mediante tratamientos que solubilizan la proteína, por medio del rompimiento de los enlaces peptídicos (Figura 2), liberando péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres, que posteriormente pueden ser separados, y recuperados. En este tipo de aplicaciones de recuperación de proteínas se opta por la hidrólisis, debido a que este tratamiento da lugar a un producto final de mayor digestibilidad que la proteína no tratada (Aurrekoetxea y Pereira, 2002).

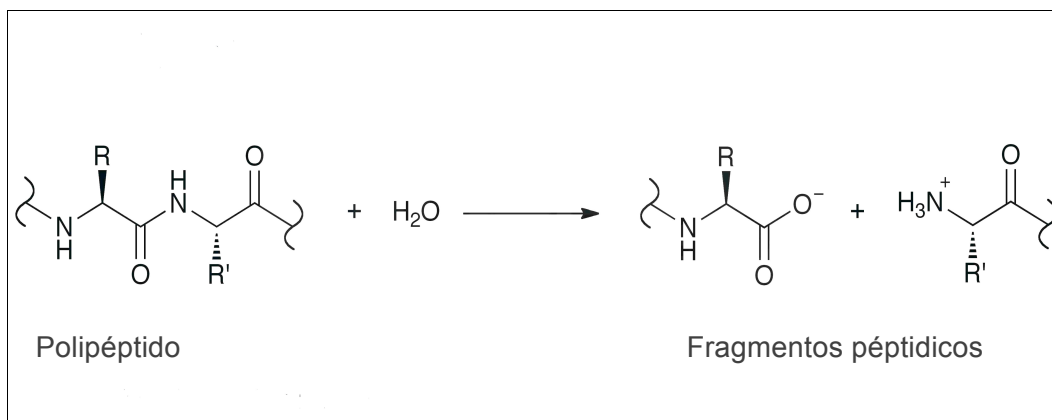


Figura 2.Rompimiento enzimático de enlaces péptidicos

Diversos estudios revelan que las proteínas derivadas de la hidrólisis de subproductos de peces, son de alto valor nutricional, ricos en aminoácidos esenciales e incluso semejantes a las proteínas de carne bovina (Kristinsson y Rasco, 2000a). También se ha visto que los hidrolizados de salmón, tratados con enzimas comerciales, presentan características funcionales (solubilidad, absorción de grasa, absorción de agua y estabilidad de la emulsión) consistentes con usos potenciales como agentes emulsificantes y agentes absorbentes; siendo potencialmente competitivos con hidrolizados proteicos existentes, como son los de

productos lácteos y vegetales, que actualmente están disponibles en el mercado (Sathivel y Smiley, 2005).

La digestión enzimática de proteínas de pescado da como resultado un FPH. Entre los problemas de la obtención de los FPH, está la extrema susceptibilidad de las grasas a oxidación, y la presencia de estos residuos de aceites que producen olores y sabores desagradables del punto de vista organoléptico (Hoyle y Merritt, 1994).

Una de las aplicaciones más importantes de los hidrolizados de proteínas es su utilización como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas entéricas con destino a la alimentación infantil y/o de adultos enfermos. Estas dietas entéricas se diseñan para ser absorbidas en el intestino sin una digestión previa en el estómago, y son esenciales en el tratamiento de pacientes con desórdenes estomacales o problemas de la mucosa intestinal, así como en lactantes con síndromes de mala absorción y mala nutrición, y con cuadros alérgicos en la mayoría de los casos (Benítez et al., 2008).

Los hidrolizados proteicos también tienen aplicaciones no alimentarias, como fuente de alimentación para el crecimiento de microorganismos, como son los hidrolizados de levaduras o caseína. Además se pueden usar como fertilizantes vegetales, así como también se usan en cosmética para el tratamiento del cabello, ya que se ha sugerido su efecto en el fortalecimiento del pelo (Vioque y Millán, 2005).

1.1. Hidrolizados proteicos

La proteólisis enzimática y la solubilización de proteínas han sido estudiadas ampliamente desde el final de los años 60 y descritas por variados y diferentes autores (Aspmo, 2005). El material de partida utilizado para la obtención de los hidrolizados proteicos puede ser de origen animal, vegetal o bacteriano. Sin embargo, hoy en día, en los países desarrollados, el sustrato más usado son las proteínas de la leche, es decir, caseínas y proteínas del lactosuero; esto es debido fundamentalmente a su disponibilidad en grandes cantidades en estos países, como un derivado de su industria, con un alto valor nutricional y moderado costo de producción. Entre los vegetales, las más usadas son las proteínas de soja, trigo y arroz. También se utilizan como sustrato proteínas de pescado, provenientes de los subproductos de la industria pesquera, principalmente en países orientales, como Japón o Corea (Vioque y Millán, 2005).

La esencia de la hidrólisis proteica es la ruptura del enlace peptídico, y en consecuencia, la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de aminoácidos libres. La ruptura de estos enlaces puede producirse por métodos químicos o biológicos. Los primeros incluyen la hidrólisis mediante el tratamiento con ácidos o bases. Hoy en día apenas se utiliza la hidrólisis química debido a sus efectos perjudiciales sobre la calidad nutricional del hidrolizado, ya que se destruyen L-aminoácidos, y se forman D-aminoácidos y compuestos tóxicos como Lisinoalanina, que al ser consumidos pueden causar daño al riñón (Vioque y Millán, 2005).

La hidrólisis biológica para producir FPH, se produce por medio de la utilización de enzimas para hidrolizar los enlaces peptídicos. Esta acción puede ser realizada por enzimas proteolíticas presentes en los propios animales, como son las enzimas viscerales y el músculo del pescado (proteasas endógenas), o por la adición de enzimas de otras fuentes (proteasas exógenas) (Kristinsson y Rasco, 2000a).

La hidrólisis enzimática presenta indudables ventajas frente a la tradicional hidrólisis química, ácida o alcalina, entre las que caben mencionar las siguientes (Guadix et al., 2000):

- **Selectividad.** Las enzimas son específicas para un tipo determinado de enlace y, por tanto, no es frecuente la aparición de productos de degradación. En cambio, la poca selectividad de los ataques ácidos y básicos, y su difícil control conduce inevitablemente a la aparición de productos de degradación que pueden llegar a ser tóxicos.
- **Condiciones moderadas de temperatura y pH.** La hidrólisis enzimática transcurre generalmente en el intervalo de 40° a 60°C y pH comprendido entre 4-8.
- **No se añaden sustancias extrañas.** Los procesos de hidrólisis química, se realizan con ácidos o bases fuertes, que posteriormente son neutralizados, elevando así considerablemente el contenido de sales del producto.
- **Se mantiene el valor nutritivo.** No se produce degradación de los componentes. La hidrólisis alcalina destruye los aminoácidos arginina y cisteína, y la hidrólisis ácida elimina el triptófano y desamina los aminoácidos serina y treonina.

Como resultado de la hidrólisis biológica, se puede obtener FPH de elevado contenido proteico y bajo contenido graso, los cuales son productos totalmente solubles (Aurrekoetxea y Pereira, 2002).

1.2. Enzimas

Las propiedades funcionales de los FPH pueden ser mejoradas por el uso de enzimas específicas y por la elección de las condiciones de hidrólisis, tales como tiempo temperatura y pH. De esta forma se puede lograr una hidrólisis parcial. Existe un número de diferentes enzimas proteolíticas (comerciales) que pueden ser usadas para la producción de hidrolizados (Liceaga-Gesualdo y Li-Chan, 1999).

1.2.1. Enzimas Endógenas

Un proceso autolítico depende de la acción de las enzimas digestivas de los mismos pescados. No hay costos involucrados, y es una operación simple. El producto final de la hidrólisis autolítica es generalmente un líquido viscoso bastante rico en aminoácidos libres y péptidos pequeños. Estas hidrólisis autolíticas son producidas a bajas temperaturas, ya que en general los peces son de aguas más bien heladas, y estas enzimas trabajan normalmente a estas temperaturas. La actividad de las enzimas endógenas en los subproductos depende de la condición fisiológica del pescado, y la forma de procesamiento de los subproductos. La desventaja es que es un proceso menos reproducible que el proceso que se produce con la adición de enzimas comerciales, debido a que la actividad de estas enzimas es variable de pez a pez y también depende de cómo se aislaron estas enzimas (Aspmo, 2005).

1.2.2. Enzimas Exógenas

La adición de enzimas exógenas hace un proceso hidrolítico más controlable y reproducible. Consecuentemente, diferentes enzimas proteolíticas comerciales se han probado sobre una variedad de sustratos de pescados. Las enzimas comerciales preferidas para las principales investigaciones son proteasas de preparación bacteriana, tales como Alcalasa, Neutrasa, y Protamex (nombres de proteasas bacterianas comerciales), pero también las proteasas de plantas, como la papaína (comercialmente llamada Corolasa L-10), tienen buenos rendimientos en los resultados (Aspmo, 2005).

Las proteasas pueden clasificarse según (Guadix et al., 2000):

- **Origen:** Animal, vegetal, bacteriano o fúngico.
- **Acción catalítica:** Endoproteasas, si rompen en el interior de las cadenas peptídicas, y exoproteasas, si separan aminoácidos de los extremos de las cadenas peptídicas (Figura 3).

- **Naturaleza del sitio catalítico:** Las endoproteasas pueden ser serinproteasas, cisteinproteasas, metaloproteasas, o aspartatoproteasas y las exoproteasas aminoproteasas, carboxiproteasas o dipeptidasas.

Las endoproteasas hidrolizan enlaces peptídicos dentro de la cadena de la proteína. Las exoproteasas, por el contrario, remueven aminoácidos terminales de las proteínas o péptidos. La naturaleza del centro catalítico de las proteasas difiere de acuerdo con los aminoácidos y otros ligandos que intervienen en la formación del complejo enzima-sustrato. El centro activo contiene aminoácidos o bien cationes metálicos que promueven la catálisis, denominándose serinproteasas, cisteinproteasas, aspartato proteasas, según intervengan los aminoácidos serina, cisteína o ácido aspártico, respectivamente. En las metaloproteasas la actividad está promovida por un catión metálico, siendo el más frecuente el zinc. Todas las serinproteasas tienen actividad endoproteasas, contrariamente, las metaloproteasas son sobre todo exoproteasas (Benítez et al., 2008).

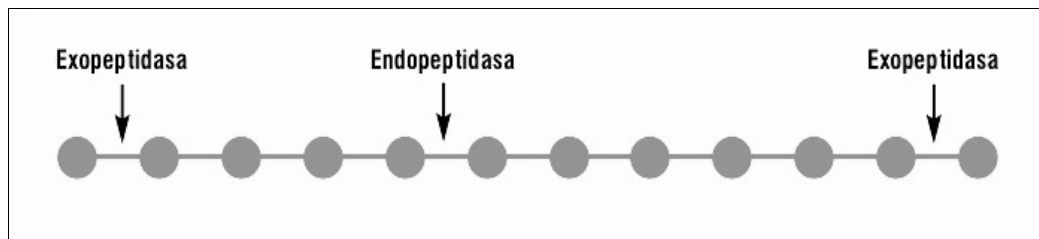


Figura 3. Clasificación de proteasas según el lugar de corte; endoproteasas o exoproteasas (Vioque y Millán, 2005).

Se ha propuesto que un proceso de hidrólisis está constituido por tres reacciones consecutivas. Primero, la formación de un complejo enzima-sustrato (proteína), como segundo paso se produce la ruptura del enlace peptídico, dando como resultado la liberación de un péptido. Finalmente, el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El proceso puede reiniciarse sobre los dos nuevos péptidos o sobre sólo uno de ellos (Kristinsson y Rasco, 2000a; Guadix et al., 2000; Benítez et al., 2008).

Todas las enzimas usadas para hidrolizar proteínas de pescado, tienen por lo menos una característica común, que es el ser de grado alimenticio, y si son de origen bacteriano, el organismo productor tiene que ser no patogénico. La elección de la enzima es usualmente determinada por una combinación de eficacia y economía (Kristinsson y Rasco, 2000a). En la elección de la o las enzimas, entra a jugar un factor preponderante, que es el uso que se

le quiera dar al producto, ya que si es en aplicaciones alimenticias, es muy importante las características organolépticas del producto, así como sus características funcionales.

1.3. Propiedades Organolépticas del hidrolizado

Aunque la hidrólisis enzimática de proteínas de pescado desarrolla propiedades funcionales deseables, tiene la desventaja de producir amargor. Esto es un problema común con los FPH, y es la principal razón para su baja aceptación como ingrediente para alimentos. El mecanismo del desarrollo del amargor no está claro aún, pero es ampliamente aceptado que los aminoácidos hidrofóbicos de los péptidos son el principal factor. Los hidrolizados de proteínas resultan en una exposición de péptidos hidrofóbicos internos, los cuales son rápidamente capaces de interactuar con las papilas gustativas, resultando en una detección del sabor amargo. Sin embargo, una extensiva hidrólisis para producir aminoácidos libres, disminuye el amargor de los péptidos, debido a que los péptidos hidrofóbicos son mucho más amargos comparados con una mezcla de aminoácidos libres, sin embargo los aminoácidos libres son indeseados desde un punto de vista funcional. Un estricto control de cualquier hidrólisis experimental y su término a valores de grados de hidrólisis bajos es, por lo tanto, deseable para prevenir el desarrollo del gusto amargo y la retención de las propiedades funcionales (Kristinsson y Rasco, 2000a; Liaset et al., 2003; Benítez et al., 2008).

Las enzimas tienen diferentes preferencias para cortar los aminoácidos, por lo que la elección de la enzima o la mezcla de enzimas más apropiada para la hidrólisis, dependiendo de la materia prima con la que se trabaje, puede ayudar a controlar el amargor. Enzimas con una alta preferencia por aminoácidos hidrofóbicos, tales como Alcalasa a menudo se prefieren y frecuentemente rinden productos con bajo amargor. El uso de exopeptidasas, en lugar de las endoproteasas, puede ser también útil en la disminución del amargor de los FPH, particularmente exopeptidasas que separan aminoácidos hidrofóbicos de péptidos amargos. Sin embargo, para que un preparado enzimático sea efectivo en la hidrólisis proteica se requieren exopeptidasas y endopeptidasas. Muchos estudios han mostrado que preparaciones proteolíticas que contienen exopeptidasas y endopeptidasas producen péptidos menos amargos que proteasas que actúan solas. La acción adicional de exopeptidasas en procesos de hidrólisis puede eliminar el sabor amargo de los hidrolizados, incluso a altos grado de hidrólisis (FitzGerald y O`Cuinn, 2006) (Figura 4).

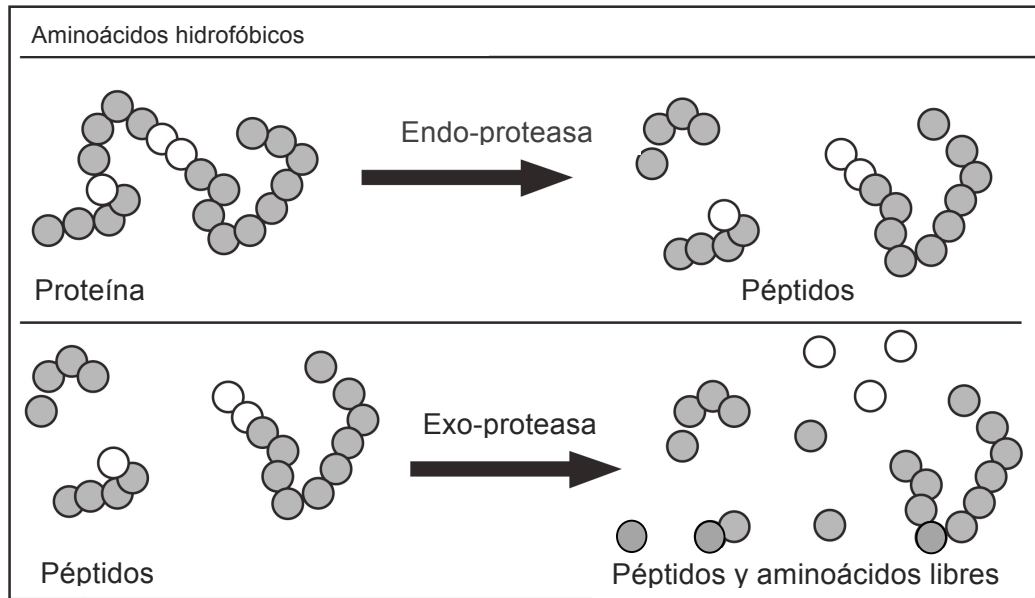


Figura 4. Hidrólisis realizada con una mezcla de diferentes proteasas.

La ruta ideal para la cuantificación del amargor del hidrolizado es el uso de paneles de evaluación sensorial. Esto es una actividad que requiere mucho tiempo y un número apropiado de panelistas, además del entrenamiento de estos para poder detectar el amargor, con el fin de obtener datos estadísticamente relevantes (FitzGerald y O`Cuinn, 2006; Seo et al., 2008).

1.4. Uso de antioxidantes en la hidrólisis

Los aceites y productos grasos en general, se someten a procesos de oxidación durante su producción y almacenamiento. Entre los principales problemas de la preparación de los FPH, está la susceptibilidad extrema de sus grasas a tal oxidación (Hoyle y Merritt, 1994). Este proceso de oxidación en los alimentos causa una secuencia de cambios desfavorables, principalmente, deterioración en las propiedades sensoriales del producto tales como rancidez, cambios en el color, textura y disminución en el valor nutricional. Además incrementa los riesgos a la salud, junto con pérdidas económicas, pudiendo inclusive influir en el desarrollo de sabores amargos (Palić y Lučan, 1995; Valenzuela et al., 2003; Gramza y Korczak, 2005; Mendis et al., 2005; Dong et al., 2008).

Los aceites de origen marino son ricos en PUFAS especialmente en aquellos de la familia ω 3 tales como EPA y DHA. Sin embargo las dietas que contienen estos aceites son más

susceptibles a la oxidación que las dietas que contienen otros tipos de aceites, debido a sus altas concentraciones de PUFAS de cadena larga, ejemplos son los ya mencionados DHA y EPA (Gonzalez et al., 1992; Fritsche y Johnston, 1988; Wanasundara y Shahidi, 1998).

La degradación de los PUFA, vía un mecanismo de reacción en cadena de radicales libres, resulta en cambios del olor y sabor (rancidez) de los aceites comestibles, y de los alimentos que contienen el aceite. Las reacciones químicas involucradas en los procesos oxidativos requieren una baja energía de activación, y sus rangos no cambian significativamente a bajas temperaturas de almacenamiento, por lo tanto, es necesario retardar el inicio de la oxidación de los aceites marinos con el fin de mantener su sabor y olor suave (Wanasundara y Shahidi, 1998; Ahn et al., 2007).

La oxidación lipídica es una reacción en cadena de radicales libres. Las etapas de la oxidación lipídica han sido distinguidas como iniciación, propagación y terminación (Figura 5) (Gramza y Korczak, 2005).

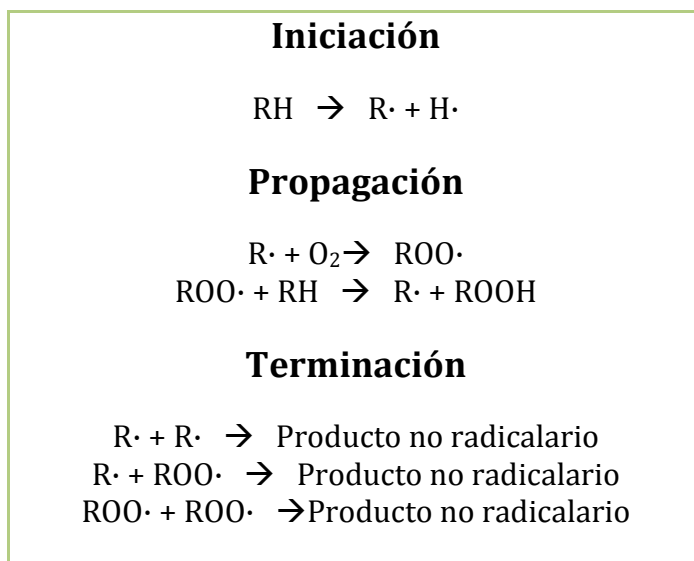


Figura 5. Proceso de oxidación lipídica.

RH: ácido graso insaturado, R·: radical alquil y ROO·: radical peroxil (Shahidi et al., 1992).

La rancidez oxidativa, tanto en alimentos como en organismos vivos, puede ser iniciada por las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). Este término combina varias especies de radicales libres, las que incluyen radicales libres centrados en el oxígeno (moléculas que contienen oxígeno activado), pero también están las que contiene especies radicales no derivadas del oxígeno. Los radicales libres contienen uno o más electrones desapareados y pueden ser formados de tres maneras: por la pérdida de un

electrón desde una molécula no radical, por la adición de un electrón a una molécula no radical, o por el corte homolítico de un enlace covalente de una molécula no radical, ya que cada fragmento retiene uno de los electrones. Este desbalance de electrones causa que el radical busque otro electrón para completar un par (Valenzuela et al., 2003).

Entre los radicales libres moléculas, tales como: anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), y los no radicales: peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y oxígeno singulete (1O_2) que en alimentos y sistemas biológicos, son generados naturalmente y pueden reaccionar con moléculas biológicas (González-Torres et al., 2000; Valenzuela et al., 2003; Díaz y Membrillo, 2006; Yu et al., 2006; Tokur y Korkmaz, 2007).

Entre las ROS, el radical hidroxilo, es uno de los radicales más dañinos, y este puede ser generado por la interacción de radical anión superóxido y peróxido de hidrogeno, especialmente en la presencia de sales de hierro. El estado ferroso del hierro acelera la oxidación de los lípidos por medio de la reacción de tipo Fenton (Tokur y Korkmaz, 2007).

El ciclo de la oxidación se inicia por medio de radicales libres, los cuales no son fácilmente detectables y en forma rutinaria se mide el producto de su oxidación, como por ejemplo, por medio del valor de peróxidos. Los productos activados continúan realimentando el fenómeno y son susceptibles de degradarse y combinarse con proteínas y vitaminas deteriorando la calidad nutritiva, funcional y organoléptica del alimento (Bacal, 2001).

La prevención de la oxidación lipídica es de gran importancia del punto de vista de la salud, y en el ámbito económico, por lo tanto, existen grandes esfuerzos para controlar este proceso. Debido a esto se utilizan las moléculas antioxidantes, que son moléculas orgánicas sintéticas o naturales, las cuales pueden retardar o evitar el proceso de rancidez oxidativa. Su acción está basada principalmente en su estructura derivada del fenol, que tiene la capacidad de donar hidrógenos para estabilizar las moléculas que producen el daño. Los antioxidantes donan hidrógenos a un radical alquil para reformar la molécula, o donan un hidrogeno a un radical libre peroxil que forma un hidroperóxido y un radical libre antioxidante, que puede ser estabilizado por resonancia (Sant y Mancini-Filho, 2000; Valenzuela et al., 2003).

1.4.1. Antioxidantes

Antioxidante es una sustancia, la cual presente en una baja concentración, en comparación con la sustancia oxidada, retarda o inhibe significativamente la oxidación de esta sustancia. Los antioxidantes son compuestos agregados a los alimentos, los cuales son usados para retardar la acumulación de radicales libres y por lo tanto fortalecen la estabilidad ante la oxidación (Gramza y Korczak, 2005).

Los antioxidantes, sintéticos y naturales, son usados comúnmente por la industria procesadora de alimentos, para prolongar la estabilidad durante el almacenamiento de los alimentos. Los principales antioxidantes sintéticos usados comúnmente son butilhidroxibutilanisol, butilhidroxitolueno, galato de propilo, y terbutilhidroquinona (BHA, BHT, PG y TBHQ, respectivamente, por sus siglas en inglés). Entre los antioxidantes naturales los tocoferoles, extractos de romero (Herbalox, producto comercial) y ácido ascórbico son a menudo preferidos (Gramza y Korczak, 2005; Yu et al., 2006).

1.4.1.1. BHA y BHT

BHA y BHT son compuestos fenólicos muy solubles en grasas, e insolubles en agua, ambos tienen buena capacidad de llevar a cabo sus efectos, pero BHT es sin embargo, más efectivo en la supresión de la oxidación de aceites animales que de aceites vegetales. Entre las múltiples aplicaciones del BHA, está la de proteger el sabor y olor de los aceites esenciales. Es considerado como el antioxidante más efectivo para esta aplicación, siendo muy eficaz en el control de la oxidación de los ácidos grasos de cadena corta (Shahidi et al., 1992).

1.4.1.2. TBHQ

TBHQ es considerado como el mejor antioxidante para proteger aceites usados en frituras contra la oxidación. TBHQ es adecuadamente soluble en grasas y no forma complejos con metales, tales como, cobre y hierro. TBHQ puede ser usado solo o en combinación con BHT o BHA, en una cantidad máxima de 200 ppm basado sobre el contenido de materia grasa, y no puede ser usado en combinación con PG (Shahidi et al., 1992).

1.4.1.3. PG

PG es escasamente soluble en agua, es un buen antioxidante para las grasas vegetales y animales. El PG pierde su actividad durante los procesos con altas temperaturas, por lo que

no es muy adecuado en tales aplicaciones, como por ejemplo en frituras donde la temperatura excede los 190°C. PG quela iones de fierro y forma un complejo azul oscuro poco atractivo, por lo tanto, PG siempre es usado con quelantes de metales, tales como acido cítrico (Shahidi et al., 1992).

1.4.1.4. Extractos de romero (Herbalox)

Este antioxidante puede ser satisfactoriamente extraído con diferentes solventes orgánicos, tales como benceno, cloroformo, dietiléter y metanol. Se ha demostrado que su uso en aceites da excelente estabilidad en el sabor de los productos probados. Los extractos de romero están disponibles comercialmente (Herbalox), y dependiendo de su uso, se recomienda utilizar en concentraciones de rangos entre 200 a 1000 ppm del producto procesado (Shahidi et al., 1992; Palić y Lučan, 1995).

Por todo lo anterior mencionado, esta tesis se enfocó principalmente en la realización de distintos procesos de hidrólisis enzimática con diferentes enzimas y antioxidantes para cada proceso, con el fin de encontrar un proceso que reduzca al máximo las desventajas de la hidrólisis enzimática (amargor del producto final y oxidación de los lípidos presentes en la materia prima usada en el proceso).

1.5. Hipótesis

“La adecuada manipulación de enzimas y antioxidantes en el proceso de hidrólisis enzimática, puede mejorar las propiedades sensoriales de los hidrolizados proteicos obtenidos.”

1.5.1. Objetivo General

- Mejorar el proceso de hidrólisis enzimática de co-productos de la industria salmonicultora chilena, para mejorar las propiedades sensoriales de los concentrados proteicos.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Ensayar el uso de diferentes enzimas en el proceso de hidrólisis.
- Ensayar el uso de diferentes antioxidantes, artificiales y naturales, en el proceso de hidrólisis.
- Demostrar que la adición de diferentes antioxidantes mejora las características del producto obtenido.
- Determinar, por medio de una evaluación organoléptica, el sabor y olor de los diferentes tipos de productos obtenidos.
- Montar una técnica para medir en terreno rápidamente el grado de hidrólisis y concentración de las proteínas en el proceso semi-industrial.
- Realizar un perfil del peso molecular aproximado de los péptidos obtenidos en cada proceso de hidrólisis enzimática y relacionar estos perfiles con las características organolépticas de los productos obtenidos
- Realizar una medición de la eficacia de los antioxidantes usados, sobre los aceites obtenidos en el proceso de hidrólisis enzimática.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Materia prima

La materia prima usada fueron cabezas de especies salmónidas (trucha arcoíris) obtenidas de la producción de MultiexportFood S. A. (Av. Cordonal N° 2501, Puerto Montt), las cuales fueron almacenadas en contenedores a 0°C hasta su trituración en un cúter, ubicado en la planta piloto del proyecto (Ruta V-85, Km 9, Calbuco, X región). Luego de la trituración la materia prima fue recolectada en bolsas de 1 kilogramo y almacenada a una temperatura de -20°C durante 48 horas, para luego ser enviada al laboratorio en Santiago donde se almacenaron a una temperatura de -20°C.

2.1.2. Enzimas

Se utilizaron tres tipos de enzimas comerciales, Alcalasa 2,4 L, Protamex (Novozymes Latin America LTDA) y Corolasa L-10 (AB Enzymes). Las características más relevantes de esta enzimas se presentan a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Características principales de las enzimas.

Características	Enzimas		
Nombre comercial	Alcalasa 2,4 L	Protamex	Corolasa L-10
Número de lote	PLN5351	PWZA1070	99149
Enzima declarada	Proteasa	Proteasa	Proteasa
Actividad declarada	2,4 AU-A/g	1,5 AU-NH/g	850 UHb/g
Color	Marrón	Marrón claro	Amarillo claro
Forma física	Líquido	Granulado	Líquido
Estabilizantes	Glicerol	Cloruro de sodio	-
Organismo de producción	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Carica papaya</i>

Fuente: Novozyme y AB Enzyme

2.1.3. Antioxidantes

Para los procesos de hidrólisis enzimática se utilizaron tres antioxidantes diferentes, Herbalox (antioxidante comercial basado en extracto de romero), Pet-Ox RC (antioxidante comercial basado principalmente en BHA y PG) y una mezcla de THBQ/BHT/EDTA adquiridos en MERCK (Darmstadt, Alemania).

- **Pet-Ox RC líquido:** Antioxidante basado principalmente en una mezcla de BHA y PG adquirido de Kemin Europa N.V., Herentals, Bélgica.
- **Herbalox (tipo O):** Antioxidante natural basado en una oleoresina de Romero, estabilizada con propilenglicol, obtenido de KALSEC, (Estados Unidos).

2.1.4. Reactivos químicos

Los reactivos usados para los análisis de porcentaje de grados de hidrólisis, determinación del índice de peróxidos de aceites de pescado, medición de la concentración de proteínas y gel de SDS PAGE, se detallan a continuación.

- **Hidróxido de sodio (NaOH):** NaOH en lentejuelas para análisis fue obtenido de LABSYNTH, Vila Mary, Diadema, (Estados Unidos)
- **Formalina (CH₂O):** CH₂O al 37% para análisis fue obtenida de WINKLER LTDA., Santiago, Chile
- **Ácido Acético (C₂H₄O₂), Cloroformo (CHCl₃), Yoduro de potasio (KI), Tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃) y Almidón (C₆H₁₀O₅)_n:** para análisis fueron obtenidos de MERCK KGaA, Darmstadt (Alemania).
- **Albúmina de suero de bovino (BSA):** BSA se utilizó para realizar la curva de calibración de proteínas versus absorbancia, y ésta fue obtenida de Fermentas LIFE SCIENCE, 798 Cromwell Park Drive, Suites R-S Glen Burnie, Maryland.
- **Reactivo de Bradford:** “Bradford Reagent, ready to use” se utilizó para la determinación de proteínas, y se obtuvo de Fermentas LIFE SCIENCE, 798 Cromwell Park Drive, Suites R-S Glen Burnie, Maryland.

2.2. Métodos

2.2.1. Hidrólisis enzimática de proteínas

Para la hidrólisis enzimática de proteína, se descongeló la materia prima almacenada a -20°C durante 15 h (hasta perder la consistencia sólida), luego se pesaron 500 g de ella y se colocaron en un vaso precipitado de 2 L. Se agregaron 500 ml de agua y el antioxidante (200 ppm para la mezcla de TBHQ/BHT/EDTA y Pet-Ox RC; y 400 ppm para Herbalox). Además se preparó una muestra sin antioxidante (SA) para permitir comparación con respecto al uso de antioxidante. Posteriormente se colocó el vaso precipitado en el baño termostático con el agua a la temperatura óptima de cada enzima (Alcalasa 2,4 L 55°C , Protamex 50°C y papaína 60°C) y se mantuvo con agitación constante (160 rpm). Una vez alcanzada la temperatura deseada en cada proceso, se agregó la enzima (Alcalasa 2,4 L 30 AU/Kg de proteína, Protamex 30 AU/Kg de proteína y Corolase L-10 0,8% del contenido respectivo de proteínas) y se hidrolizó durante 50 min. Transcurridos los 50 min se procedió a inactivar la enzima por medio de la elevación de la temperatura de hidrólisis a una temperatura de 95°C durante 5 min. Luego se procedió a sacar el vaso precipitado para posteriormente separar la fracción de huesos. Una vez separada la fracción de huesos se procedió a separar las distintas fracciones de la hidrólisis por medio de la decantación por temperatura (120 min a 95°C). Transcurrido el tiempo, se procedió a recolectar la fase soluble, posteriormente la fase insoluble se centrifugó a 3864 RCF (6000 rpm) durante 15 min. Luego de la centrifugación se forman 4 fases, aceite, emulsión, soluble e insoluble, las cuales son recolectadas. La fase soluble recolectada con la centrifugación es agregada con la fase soluble extraída anteriormente por el proceso de decantación. El aceite obtenido se almacenó a una temperatura de 4°C por treinta días. Se realizó un seguimiento de la oxidación de los lípidos en el tiempo, tomando mediciones a los 0, 10, 20 y 30 días. Lo anterior se resume en el siguiente diagrama Figura 6.

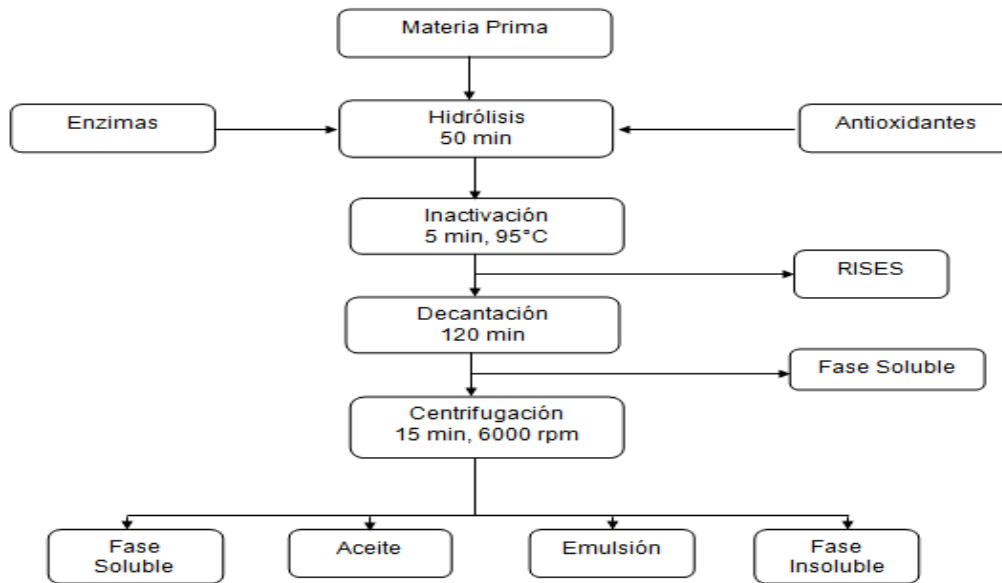


Figura 6. Diagrama de bloques del proceso. Rises: residuos solidos insolubles.

2.2.2. Concentrado y secado de muestras

La fase soluble recolectada en el proceso de hidrólisis enzimática (500 ml promedio para 500 gramos de materia prima) es posteriormente concentrada en un rotavapor. Se agregaron los 500 ml de fase soluble (a una concentración promedio de 8 grados Brix), y se concentraron en el rotavapor al vacío a una temperatura de 40°C por un promedio de 45 min, hasta obtener una solución viscosa de 80 ml (a una concentración mayor a 30° Brix). Luego la fase soluble concentrada se almacenó en recipientes y se congeló hasta una temperatura de -20°C. Posteriormente la muestra se secó en un liofilizador por el tiempo necesario hasta que se formara un polvo totalmente seco, después de eso la muestra se almacenó a una temperatura de -20°C hasta su posterior uso en la evaluación sensorial.

2.2.3. Medición del porcentaje de Grado de Hidrólisis (%GH)

Para medir el grado de hidrólisis se utilizó una variante del método de titulación con formol, descrita por Taylor (1957). Este método se basa en la reacción de los aminoácidos con el formaldehído liberando un ión de H⁺ por cada grupo amino libre, los que pueden ser titulados con una solución de hidróxido de sodio. La desventaja de esta técnica es que los grupos amino de la histidina no reaccionan con formaldehído, y los grupos amino de la prolina e

hidroxiprolina reaccionan sólo en un 75%, por lo cual si la muestra en cuestión contiene una cantidad significativa de estos aminoácidos debe ser evaluada por otra metodología.



Protocolo

1. Pesar aproximadamente 1,5 g de materia prima líquida (aproximadamente 0,3-0,4 g de proteína), y anotar el peso exacto de cada muestra.
2. Añadir $\text{H}_2\text{O}_{(d)}$ hasta completar exactamente 50 g por muestra.
3. Agitar con magneto, y llevar a pH 7,0 con NaOH 0,1 M (trabajar bajo campana de extracción).
4. Añadir 10 ml de formaldehído agitando, dejar con agitación durante 5 min.
5. Al cabo de los 5 minutos titular la muestra hasta pH 8,5 con NaOH 0,1 M, y registrar la cantidad de NaOH utilizada por cada muestra.
6. Para calcular el % de grupos aminos libres, utilizar la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Grupos amino libres (D)} = (\text{A} \times \text{B} \times 14.007 \times 1000) / (\text{C} \times 100)$$

A = ml de NaOH utilizados en la titulación

B = Concentración del titulante (NaOH 0,1 M)

C = g de materia prima (líquido) por muestra

7. Para calcular el grado de hidrólisis (%), utilizar la siguiente fórmula:

$$\% \text{GH} = (\text{D} \times 100) / \text{E}$$

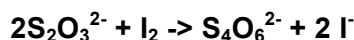
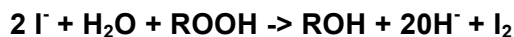
E = % Grupos amino totales (medio 6,25) dividido por la cantidad de proteínas.

D = % Grupos amino libres

2.2.4. Determinación de índice de peróxidos en aceite de pescado

Se midió el índice de peróxidos a los aceites obtenidos en cada proceso de hidrólisis, como un promedio de las tres enzimas utilizadas, para cada antioxidante y se comparó con un proceso sin antioxidante. La determinación del índice de peróxido (PV) se realizó empleando el protocolo de la Norma Chilena (Instituto Nacional de Normalización, 2002) para tal determinación. Este método determina por yodometría todas las sustancias que oxidan al

yoduro de potasio bajo las condiciones especificadas en esta norma. Generalmente, estas sustancias son asumidas como peróxidos u otros productos similares provenientes del proceso de oxidación. El yodo liberado se titula con una solución valorada de tiosulfato de sodio según la siguiente reacción.



Protocolo:

1. Pesar $5,00 \pm 0,05$ g de la grasa (o aceite) en un matraz erlenmeyer de 250 ml con tapa de vidrio.
2. Añadir 50 ml de la solución $\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CHCl}_3$ y agitar para disolver.
3. Añadir 0,5 ml de la solución saturada de KI, agitar vigorosamente y dejar reposar en la oscuridad durante 1 minuto.
4. Añadir unos 30 ml de $\text{H}_2\text{O}_{(d)}$.
5. Titular inmediatamente el yodo liberado con tiosulfato de sodio 0,01 N; agitando vigorosamente hasta que el color amarillo casi desaparezca.
6. Añadir alrededor 0,5 ml de solución de almidón al 1% y continuar titulando (al final de la titulación agitar vigorosamente para extraer todo el yodo de la capa de cloroformo) hasta que el color azul desaparezca. Registrar el volumen (V_1).
7. Realizar en paralelo un blanco de reactivos. Registrar el volumen (V_2) en mililitros de tiosulfato de sodio utilizado. Este valor no puede exceder de 1 ml.
8. Para calcular el índice de peróxido, expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramos de muestra, se usa la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de peróxidos (PV)} = [(V_1 - V_2) \times N \times 1000] / M$$

2.2.5. Medición de la concentración de proteínas por método de Biuret

Se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos (Bozimowski et al., 1982).

Protocolo:

1. Se homogeniza la solución patrón a tomar y se agrega la cantidad indicada a cada cubeta, dependiendo del tamaño de ésta.
2. Se agrega la cantidad indicada de $H_2O_{(d)}$ para cada cubeta.
3. Luego se agrega el reactivo de Biuret en cada cubeta.
4. Se agitan las cubetas y se deja reposando durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Transcurrido el tiempo se procede a medir la absorbancia a 545 nm.
6. Se realiza una curva de calibración Abs/prot.
7. La muestra desconocida se mide y se interpola en la recta obtenida de la solución patrón para así obtener la cantidad de proteínas en la muestra. En caso de estar más alta que la curva realizar las diluciones necesarias.

2.2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se utilizaron geles desnaturantes de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida 30:0,8). Con un gel concentrador al 5% y un gel separador al 10% (García, 2000). Los concentrados proteicos se desnaturalan con amortiguador de muestra (10% glicerol, 64 mM Tris-HCL pH 6,8; SDS al 2%, azul de bromofenol al 0,01% y β -mercaptoetanol al 5%) durante 7 minutos a 95°C. Se cargan 100 μ g de proteína total para la detección de proteína. Los geles se someten a electroforesis en amortiguador de corrida (glicina 0,2 M, Tris Base 25 mM, SDS al 0,1 %) a 200 V durante 45 min. Posterior a esto se tiñen con una solución diluida de azul de Coomassie durante 2 horas. Al cabo de esto se someten a sucesivos lavados con una solución diluida de ácido acético hasta decolorar el gel y distinguir las bandas correspondientes a las proteínas y pépticos. Fotografiar el gel para su posterior análisis.

2.2.7. Grados Brix.

Los °Brix son una forma de medir el contenido de sacarosa en una solución, esta medición es realizada a través de un refractómetro, y puede ser consistente con la cantidad de sólidos presentes en una solución. Se utilizó un refractómetro de Reicherts Scientific Instrument, con una escala graduada de 0 a 32 °Brix.

2.2.8. Evaluación Sensorial

La evaluación sensorial se llevó a cabo con un panel entrenado de 10 jueces, para la detección del amargor. Este entrenamiento se realizó con un set de soluciones de cafeína anhidra a distintas concentraciones, para lo cual se solicitó a los jueces ordenaran en orden creciente con respecto al gusto amargo. Posteriormente se seleccionó a aquellos jueces con mayor porcentaje de acertación.

Las muestras fueron preparadas y luego almacenadas a temperatura de -20°C hasta el día de la evaluación sensorial. Cerca de 24 horas antes del análisis se sacaron las muestras del congelador y se llevaron a una temperatura de 4°C.

Para la evaluación de las muestras los jueces usaron una escala no estructurada de 10 cm; en ésta los jueces deben realizar una marca en la línea de acuerdo al puntaje que ellos asignen a los atributos evaluados en cada muestra, según el procedimiento indicado por Wittig (Wittig, 2001).

Los atributos evaluados correspondieron a los siguientes: olor, sabor amargo y aceptabilidad general. La evaluación procedió primero sin probar la muestra, indicando la intensidad del olor característico a pescado percibido, luego, al probar la muestra debieron indicar la intensidad del amargor percibido y finalmente la aceptabilidad general de las muestras.

2.2.9. Análisis estadístico

Todas las mediciones se realizaron en triplicado y los resultados fueron expresados como “promedio \pm desviación estándar”. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) simple y el Test de Tukey, para determinar la significancia de las diferencias entre los valores promedio con un nivel de significancia del 5%. Este análisis estadístico se realizó en el programa *Statgraphic Centurion* y se aplicó a los resultados obtenidos de los ensayos de hidrólisis enzimática, índice de peróxidos de aceite de pescado, grado de hidrólisis, concentración de proteínas y el test sensorial. Para este último se utilizó análisis de varianza de dos vías.

3. RESULTADOS

3.1. Diseño experimental

Se trabajó con 3 enzimas, Alcalasa (AL), Protamex (PT) y Corolasa (CO). Cada enzima fue probada con 3 antioxidantes diferentes, una mezcla de TBHQ/BHT/EDTA (TBE), Herbalox (Hx) y Pet-Ox RC (Px), y además se realizó un proceso sin antioxidante (SA). Cada proceso se hizo en duplicado, dando un total de 24 procesos de hidrólisis enzimática. Luego la fase soluble de cada proceso se concentró para posteriormente liofilizarse. En las tablas 2, 3 y 4 se muestra el diseño experimental completo y las condiciones de cada proceso de hidrólisis realizado. Todos los análisis realizados en esta tesis fueron hechos en triplicado.

Tabla 2. Diseño experimental de los procesos de hidrólisis detallados para Alcalasa.

Alcalasa (AL)								
Experiencias	1	1a	2	2a	3	3a	4	4a
Temperatura	55°	55°	55°	55°	55°	55°	55°	55°
Relación sustrato/agua	1	1	1	1	1	1	1	1
Enzima (A.U.)	30	30	30	30	30	30	30	30
Tiempo (m)	50	50	50	50	50	50	50	50
Materia Prima (g)	500	500	500	500	500	500	500	500
Proteína Total (g)	56,5	56,5	56,5	56,5	56,5	56,5	56,5	56,5
Agua (ml)	500	500	500	500	500	500	500	500
Antioxidante	SA	SA	TBE	TBE	Hx	Hx	Px	Px
Antioxidante (ppm)	0	0	200	200	400	400	200	200

Donde los procesos (1 y 1a) sin antioxidante; (2 y 2a) con TBE como antioxidante; (3 y 3a) con Hx como antioxidante y (4 y 4a) con Px como antioxidante. Los procesos "a" corresponden a los duplicados.

Tabla 3. Diseño experimental de los procesos de hidrólisis detallados para Protamex.

Protamex (PT)								
Experiencias	1	1a	2	2a	3	3a	4	4a
Temperatura	50°	50°	50°	50°	50°	50°	50°	50°
Relación sustrato/agua	1	1	1	1	1	1	1	1
Enzima (A.U.)	30	30	30	30	30	30	30	30
Tiempo (m)	50	50	50	50	50	50	50	50
Materia Prima (g)	500	500	500	500	500	500	500	500
Proteína Total (g)	56,5	56,5	56,5	56,5	56,5	56,5	56,5	56,5
Agua (ml)	500	500	500	500	500	500	500	500
Antioxidante	SA	SA	TBE	TBE	Hx	Hx	Px	Px
Antioxidante (ppm)	0	0	200	200	400	400	200	200

Donde los procesos (1 y 1a) sin antioxidante; (2 y 2a) con TBE como antioxidante; (3 y 3a) con Hx como antioxidante y (4 y 4a) con Px como antioxidante. Los procesos "a" corresponden a los duplicados.

Tabla 4. Diseño experimental de los procesos de hidrólisis detallados para Corolasa.

Corolasa (CO)								
Experiencias	1	1 ^a	2	2 ^a	3	3 ^a	4	4 ^a
Temperatura	60°	60°	60°	60°	60°	60°	60°	60°
Relación sustrato/agua	1	1	1	1	1	1	1	1
Enzima (% Proteína)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Tiempo (m)	50	50	50	50	50	50	50	50
Materia Prima (g)	500	500	500	500	500	500	500	500
Proteína Total (g)	56,5	56,5	56,5	56,5	56,5	56,5	56,5	56,5
Agua (ml)	500	500	500	500	500	500	500	500
Antioxidante	SA	SA	TBE	TBE	Hx	Hx	Px	Px
Antioxidante (ppm)	0	0	200	200	400	400	200	200

Donde los procesos (1 y 1a) sin antioxidante; (2 y 2a) con TBE como antioxidante; (3 y 3a) con Hx como antioxidante y (4 y 4a) con Px como antioxidante. Los procesos "a" corresponden a los duplicados

3.2. Análisis proximal de la materia prima.

Las materias primas utilizadas fueron cabezas de trucha arcoíris, obtenidas en Puerto Montt. En esta tesis se trabajó sólo con cabezas, ya que eran las únicas que aseguraban todo el cuidado adecuado para mantener la calidad para consumo humano.

Los resultados del análisis proximal, de la composición de la materia prima, se observan en la Tabla 5.

Tabla 5. Valores obtenidos del análisis proximal de la materia prima (cabezas de salmones).

Composición	Materia prima
Humedad (%)	66
Proteínas (%)	11,3
Lípidos (%)	16,7
Cenizas (%)	6

El análisis de la materia prima es fundamental, ya que en base a estos resultados se pueden calcular los análisis, tales como porcentaje de grado de hidrólisis (porcentaje de hidrólisis), cantidad de enzima a usar, rendimiento de la recuperación de proteínas, entre otros. Junto con este análisis, también se realizó un análisis del perfil de aminoácidos presentes en la materia prima y en los hidrolizados proteicos (Anexo 1).

3.3. Hidrólisis Enzimática.

Los resultados de la hidrólisis enzimática están detallados en las tablas 6 a la 8, las cuales indican las diferentes fracciones obtenidas en cada proceso.

Tabla 6. Diferentes fracciones obtenidas en los procesos de hidrólisis con Alcalasa.

Alcalasa								
Proceso	1	1a	2	2a	3	3a	4	4a
Huesos (g)	72,6	82,6	88,4	90,4	102	87,8	87,2	90
Fase Soluble (ml)	540	500	610	580	520	540	545	560
Insoluble (g)	106,3	137,6	99,2	106,2	90	99,4	95,1	97,6
Emulsión (g)	57,5	43,4	27,6	32,4	64,9	62	33,1	38,8
Aceite (ml)	65	62,5	72	70	67	70	72	82
°Brix	8,5	8,8	7,7	7,8	8,8	8,6	8,5	8,5

Donde los procesos (1 y 1a) sin antioxidante; (2 y 2a) con TBE como antioxidante; (3 y 3a) con Hx como antioxidante y (4 y 4a) con Px como antioxidante. Los procesos "a" corresponden a los duplicados.

Tabla 7. Diferentes fracciones obtenidas en los procesos de hidrólisis con Protamex.

Protamex								
Proceso	1	1a	2	2a	3	3a	4	4a
Huesos (g)	89,4	86,6	90,4	96,6	105,6	98,6	91,2	91
Fase Soluble (ml)	540	575	630	650	560	562	580	570
Insoluble (g)	78	109,2	87	87,8	82,3	94,6	84,2	83,2
Emulsión (g)	32,8	31,5	26,3	21,1	32,8	34,7	37	61,6
Aceite (ml)	70	75	72	71	75	73	83	75
°Brix	9	9	7,6	7,5	9,1	8,7	9	9

Donde los procesos (1 y 1a) sin antioxidante; (2 y 2a) con TBE como antioxidante; (3 y 3a) con Hx como antioxidante y (4 y 4a) con Px como antioxidante. Los procesos "a" corresponden a los duplicados.

Tabla 8. Diferentes fracciones obtenidas en los procesos de hidrólisis con Corolasa.

Corolasa								
Proceso	1	1a	2	2a	3	3a	4	4a
Huesos (g)	101	124	101	106,8	126,6	109,6	103,6	97,6
Fase Soluble (ml)	490	450	530	505	440	430	500	475
Insoluble (g)	109,1	116,9	107,3	113,3	100,5	130,8	115	136,7
Emulsión (g)	34,5	52,7	18,3	21	38,5	47	36,7	50,1
Aceite (ml)	70	75	72	69	53	65	70	65
°Brix	8,1	8	7,5	7,5	8,5	8,5	8,3	8

Donde los procesos (1 y 1a) sin antioxidante; (2 y 2a) con TBE como antioxidante; (3 y 3a) con Hx como antioxidante y (4 y 4a) con Px como antioxidante. Los procesos "a" corresponden a los duplicados.

Las fracciones más importantes para este trabajo fueron la fase soluble en donde queda la mayor parte del contenido proteico después de la hidrólisis, y la fase lipídica, que también se utilizó para realizar análisis. Las otras fracciones, emulsión, huesos e insoluble, no fueron consideradas, pero ellas también tienen un uso potencial si se les trata adecuadamente.

3.4. Grado de hidrólisis.

El grado de hidrólisis es el parámetro fundamental de una hidrólisis enzimática, es una forma de saber cuánto se hidrolizó la proteína, es decir cuánto se cortó con respecto a su estado inicial. Es importante saber este dato debido a que puede influir en las características finales del hidrolizado proteico, como por ejemplo, en sus propiedades funcionales y organolépticas (Kristinsson y Rasco, 2000a).

Los resultados del porcentaje de hidrólisis se analizaron con respecto al proceso en general, en donde se comparan las tres enzimas y los 4 antioxidantes estudiados. También se analizaron con respecto al proceso en particular, en donde se comparan los cuatro antioxidantes usados, para cada enzima por separado, con lo que se obtiene un acercamiento general del proceso y uno en particular.

Los resultados del porcentaje de hidrólisis para cada enzima se muestran en la Figura 7.

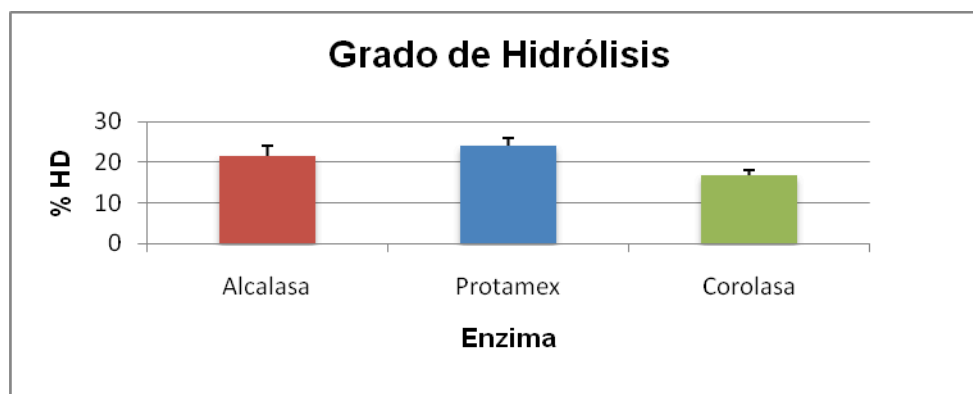


Figura 7. Resultados promedio del porcentaje de hidrólisis para cada enzima.

Los resultados muestran que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las enzimas usadas en todos los procesos, dando Protamex como la enzima que produjo un mayor porcentaje de hidrólisis, luego Alcalasa y por último Corolasa.

Los resultados del porcentaje de hidrólisis para cada antioxidante en general se indican en la Figura 8.

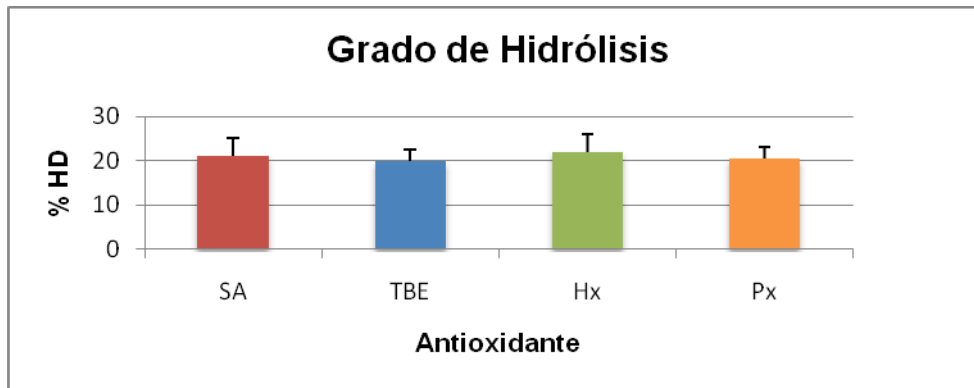


Figura 8. Resultados del promedio del porcentaje de hidrólisis para cada antioxidante usado en el proceso.

Los resultados indican que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los antioxidantes utilizados para el %GH obtenido, siendo el proceso realizado con Hx significativamente mayor, con respecto a los procesos realizados con Px y TBE, pero no así con el proceso realizado en la muestra sin antioxidante.

A continuación se procederá a revisar los resultados en particular para cada enzima usada en la hidrólisis.

3.4.1. Grado de hidrólisis con Alcalasa como enzima.

Los resultados del porcentaje de hidrólisis con Alcalasa se muestran en la Figura 9.

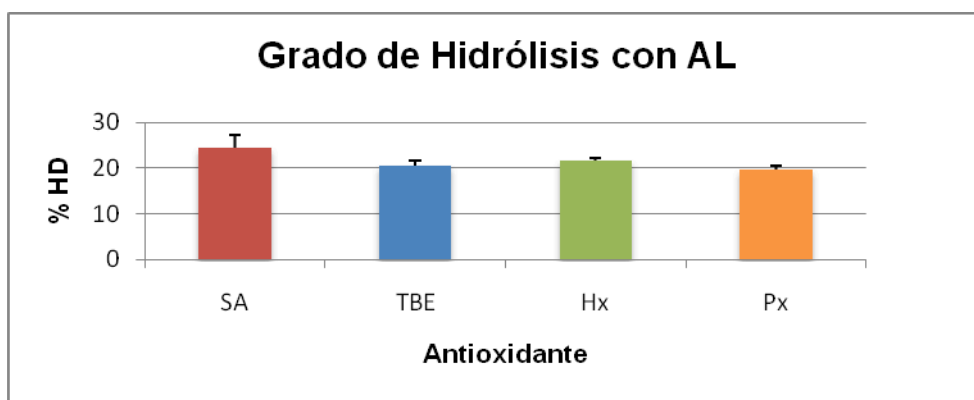


Figura 9. Resultados del porcentaje de hidrólisis obtenido por cada antioxidante en el proceso de hidrólisis enzimática con Alcalasa.

Los resultados indican que para el proceso con Alcalasa, el valor del porcentaje de hidrólisis fue significativamente ($p < 0,05$) mayor, en el proceso con SA respecto a los otros tres procesos (TBE, Hx y Px), los cuales no presentan diferencias significativas entre ellos.

3.3.2. Grado de hidrólisis con Protamex como enzima.

Los resultados del porcentaje de hidrólisis con Protamex se muestran en la Figura 10.

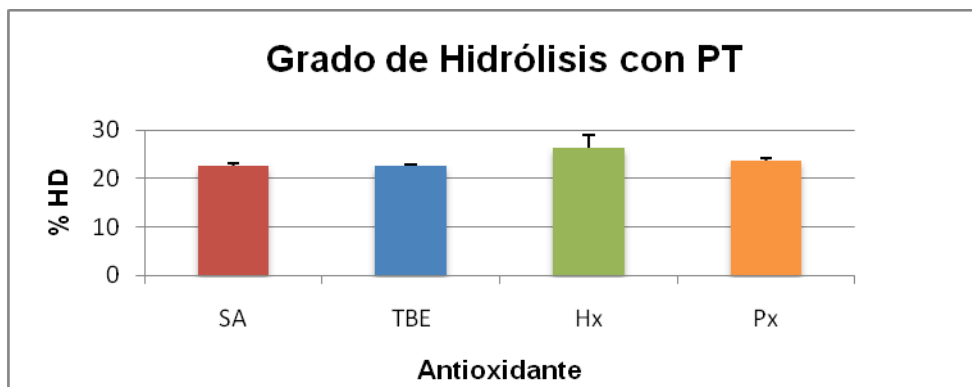


Figura 10. Resultados del porcentaje de hidrólisis obtenido por cada antioxidante en el proceso de hidrólisis enzimática con Protamex.

Los resultados indican que para el proceso con Protamex, el valor del porcentaje de hidrólisis fue significativamente ($p < 0,05$) mayor, en el proceso con Hx respecto a los otros tres procesos (SA, TBE, y Px), los cuales no presentan diferencias significativas entre ellos.

3.4.3. Grado de hidrólisis con Corolasa como enzima.

Los resultados del porcentaje de hidrólisis con Corolasa se muestran en la Figura 11.

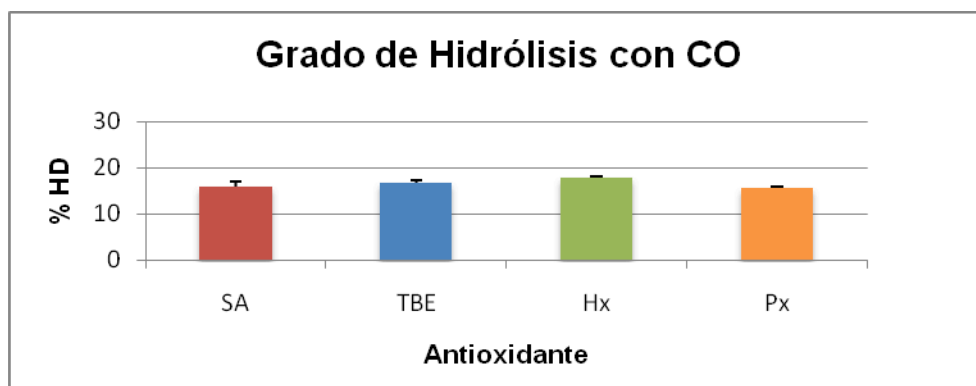


Figura 11. Resultados del porcentaje de hidrólisis obtenido por cada antioxidante en el proceso de hidrólisis enzimática con Corolasa.

Los resultados indican que para el proceso con Corolasa, el valor del porcentaje de hidrólisis fue significativamente ($p < 0,05$) menor, en el proceso con SA respecto a los procesos realizados con Hx y Px, no así con el proceso realizado con TBE, donde no se encontró diferencia significativa con SA.

3.5. Evolución del Índice de peróxidos en el aceite obtenido en el proceso de hidrólisis.

La medición del índice de peróxidos en el aceite es una manera de saber cuan eficaz fue el antioxidante usado en el proceso de hidrólisis, y cómo protege al aceite de la oxidación en el tiempo.

Los resultados del seguimiento se observan en la Tabla 9.

Tabla 9. Promedios de oxidación lipídica para cada antioxidante en el tiempo.

Antioxidante	Promedio 0 días	Promedio 10 días	Promedio 20 días	Promedio 30 días
SA	2,0 ± 0,26	15,1 ± 0,97	29,1 ± 1,60	42,3 ± 3,63 ^a
TBE	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,0 ± 0,00	0,3 ± 0,70 ^b
Hx	1,5 ± 0,79	16,3 ± 1,95	26,2 ± 2,22	37,5 ± 4,46 ^a
Px	1,8 ± 0,80	19,8 ± 4,40	32,0 ± 2,40	43,3 ± 4,30 ^a

Valores expresados en mEq O₂/Kg de materia grasa. Donde (SA) proceso sin antioxidante.

Los resultados estadísticos para el día 30, indican que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el antioxidante TBE y los otros tres sistemas estudiados. El sistema con TBE

dio un valor muy diferente, en donde el promedio de oxidación de lípidos fue menor a 1 mEq O₂/Kg, y para los demás sistemas se registraron valores mayores de 37 mEq O₂/Kg.

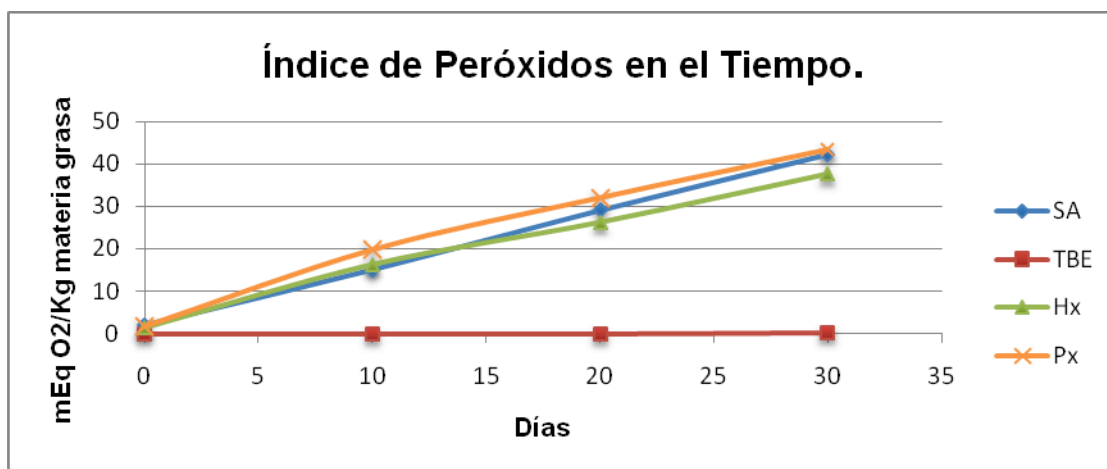


Figura 12. Oxidación lipídica para cada antioxidante en el tiempo.

En la figura 12 se puede observar una clara desviación del promedio del índice de peróxido para el antioxidante TBE, el cual se mantuvo en valores cercanos a 0 mEq O₂/Kg de materia grasa, durante el periodo de análisis (30 días). En cambio, en los otros sistemas, a medida que pasaban los días, el índice de peróxidos aumentó progresivamente hasta valores sobre los 30 mEq O₂/Kg de materia grasa.

3.6. Proteínas

Las proteínas son el producto principal de la hidrólisis, y fueron recolectadas principalmente en la fase soluble de la hidrólisis generalmente en forma de péptidos y aminoácidos libres, dependiendo de la enzima en uso.

Se realizaron mediciones de las proteínas presentes en la fase soluble obtenida después del proceso de hidrólisis enzimática y a los hidrolizados proteicos, obtenidos después del proceso de liofilización. La cantidad de proteínas se expresó en porcentaje de proteína con respecto al contenido de sólidos presentes en la muestra, para cada hidrolizado.

3.6.1. Proteínas de la fase soluble

En la Tabla 10 se presentan los resultados obtenidos de la medición de proteínas de la fase soluble inmediatamente después de ser recolectada, antes del proceso de concentración y posterior liofilización de la muestra.

Tabla 10. Contenido de proteína en las muestras de fase soluble de cada proceso de hidrólisis.

Muestra	% Proteína	Muestra	% Proteína
AL 1	61,9 ± 0,7	AL1A	62,9 ± 1,3
AL 2	65,1 ± 1,2	AL2A	61,6 ± 0,5
AL 3	62,2 ± 0,6	AL3A	59,1 ± 1,2
AL 4	64,1 ± 0,7	AL4A	62,6 ± 1,1
PT 1	61,9 ± 1,7	PT1A	53,3 ± 0,5
PT 2	65,1 ± 0,6	PT2A	56,9 ± 1,9
PT 3	62,2 ± 0,4	PT3A	54,0 ± 0,8
PT 4	64,1 ± 2,5	PT4A	54,3 ± 1,5
CO 1	63,1 ± 0,9	CO1A	65,9 ± 0,4
CO 2	67,5 ± 2,1	CO2A	65,7 ± 0,4
CO 3	69,2 ± 0,4	CO3A	66,0 ± 0,9
CO 4	68,1 ± 1,2	CO4A	63,4 ± 1,8

Donde (AL) Alcalasa, (PT) Protamex, (CO) Corolasa. Los procesos (1 y 1a) sin antioxidante; (2 y 2a) con TBE como antioxidante; (3 y 3a) con Hx como antioxidante y (4 y 4a) con Px como antioxidante. Los procesos "A" corresponden a los duplicados

Los resultados indican un porcentaje de proteínas en la fase soluble de los procesos significativamente mayor ($p < 0,05$) para los sistemas realizados con Corolasa, luego con Alcalasa y finalmente con Protamex.

En la Figura 13, se muestra el gráfico del promedio de las proteínas obtenidas.

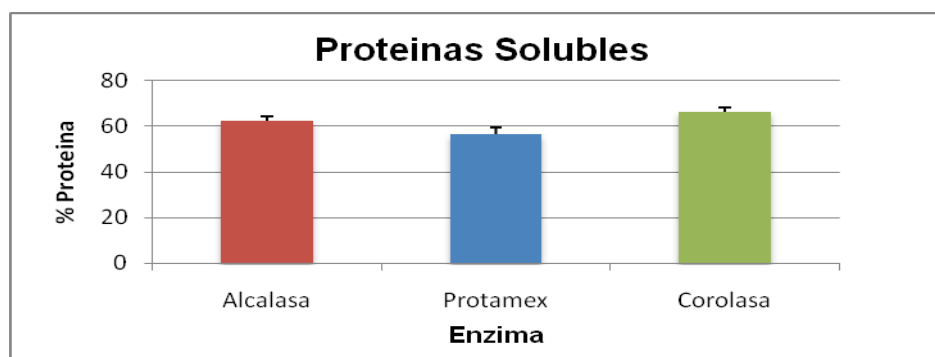


Figura 13. Contenido de proteína promedio en la fase soluble de cada proceso de hidrólisis obtenido con cada enzima.

3.6.2. Proteínas del Hidrolizado Proteico Liofilizado

En la Tabla 11 se presentan los resultados obtenidos en la medición de proteínas del hidrolizado proteico, obtenidas después del proceso de concentración y liofilización.

Tabla 11. Contenido de proteína en las muestras de hidrolizado proteico liofilizado de cada proceso.

Muestra	% Proteína			Muestra	% Proteína		
AL 1	69,9	±	1,6	AL1A	73,7	±	1,1
AL 2	70	±	2,9	AL2A	68,5	±	1,9
AL 3	68,7	±	0,6	AL3A	67,4	±	1,4
AL 4	69,5	±	2,0	AL4A	69,3	±	1,5
PT 1	62,7	±	1,2	PT1A	64,9	±	1,6
PT 2	65,6	±	2,0	PT2A	63,5	±	0,6
PT 3	66	±	1,7	PT3A	63,4	±	1,1
PT 4	63,9	±	1,1	PT4A	63,4	±	1,4
PT 1	74,6	±	0,6	CO1A	75,9	±	0,3
PT 2	73,9	±	1,6	CO2A	76,2	±	1,2
PT 3	74,6	±	1,4	CO3A	75,1	±	0,7
PT 4	73,4	±	1,2	CO4A	73,3	±	1,7

Donde (AL) Alcalasa, (PT) Protamex, (CO) Corolasa. Los procesos (1 y 1A) sin antioxidante; (2 y 2A) con TBE como antioxidante; (3 y 3A) con Hx como antioxidante y (4 y 4A) con Px como antioxidante. Los procesos "A" corresponden a los duplicados

Al igual que en el caso anterior los resultados indican un mayor porcentaje de proteínas presentes en los procesos realizados con Corolasa, luego con Alcalasa y finalmente con Protamex.

En la Figura 14 se muestra el gráfico de los resultados.

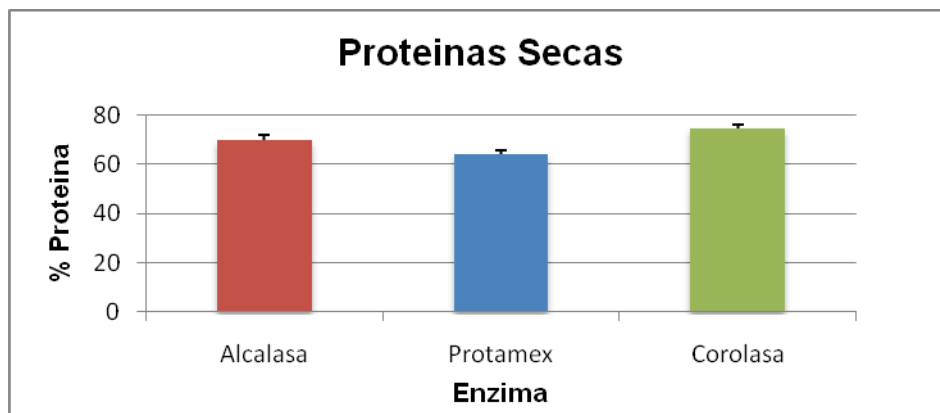


Figura 14. Porcentaje de proteínas presentes en el hidrolizado proteico liofilizado obtenido con cada enzima.

Los resultados muestran que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las distintas enzimas en el porcentaje promedio de proteínas obtenidas de los hidrolizados proteicos, mostrando la enzima Corolasa un porcentaje de proteínas significativamente mayor, con respecto a Alcalasa y Prótamex.

3.6.3. Rendimiento del proceso.

Además de la medición del porcentaje de proteínas en las muestras de los hidrolizados, es importante destacar el rendimiento del proceso en general. Este dato se obtuvo mediante la cantidad de proteínas recuperadas con respecto a la cantidad de proteínas agregadas en el proceso.

En la Figura 15 se observa el promedio del rendimiento de cada proceso.

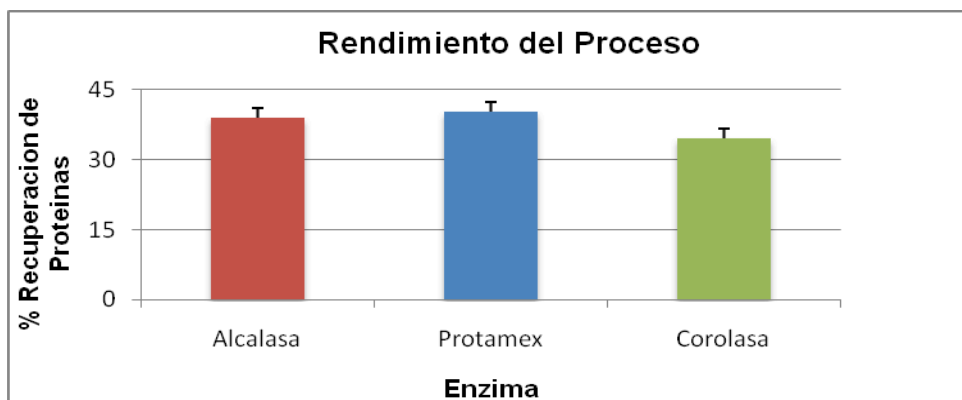


Figura 15. Rendimiento promedio de la recuperación de proteínas desde la materia prima.

Los resultados estadísticos indican que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la enzima Corolasa, la cual fue significativamente menor, y las otras dos enzimas usadas, con respecto al rendimiento de la hidrólisis. Esto es un detalle importante debido a que los mayores porcentajes de proteína en la fase soluble y en el hidrolizado seco fueron para Corolasa, pero la cantidad de fase soluble producida en los otros procesos realizados con Alcalasa y Protamex fue mayor y por consiguiente la cantidad de hidrolizados proteico en polvo también fue mayor, lo que llevo a una mayor recuperación de proteínas.

3.7. Curvas de hidrólisis.

Para observar el comportamiento del proceso de hidrólisis, se realizaron curvas de hidrólisis durante un tiempo de 60 minutos. Cada 10 minutos se tomó una alícuota de 50 ml e inmediatamente se procedió a inactivar la enzima, por medio de “golpes” de temperatura (5 minutos a 95°C) para luego centrifugadas a 3864 RCF durante 15 minutos y posteriormente extraer la fase soluble para los análisis (Figura 16).



Figura 16. Diferentes fases obtenidas luego de la centrifugación, de arriba abajo: aceite, emulsión, fase soluble y fase insoluble.

A la fase soluble se le realizaron mediciones de porcentaje de grado de hidrólisis, cantidad de proteína presente, pH y °Brix. Los resultados para estos análisis se muestran en las Tablas 12 a la 14.

Tabla 12. Hidrólisis con Alcalasa a diferentes tiempos.

Alcalasa				
Tiempo	pH	° Brix	%GH	Prot. (mg/ml)
0	6,36	5,0	0,0 ± 0,0	37,6 ± 0,9
10	6,15	6,9	14,5 ± 0,2	49,5 ± 0,5
20	6,03	7,5	17,9 ± 0,3	42,7 ± 0,2
30	5,98	7,9	18,8 ± 0,1	54,6 ± 0,5
40	5,92	8,2	19,6 ± 0,1	49,4 ± 0,8
50	5,89	8,5	20,4 ± 0,2	52,0 ± 0,2
60	5,88	8,7	22,5 ± 0,4	53,5 ± 0,6

Tabla 13. Hidrólisis con Protamex a diferentes tiempos.

Protamex				
Tiempo	pH	° Brix	%GH	Prot. (mg/ml)
0	6,43	4	0,0 ± 0,0	29,8 ± 0,5
10	6,12	6,6	17,1 ± 0,1	35,8 ± 1,3
20	6,09	7,2	18,3 ± 0,1	43,3 ± 1,3
30	6,07	7,6	21,7 ± 0,5	44,9 ± 0,5
40	6,04	8	22,9 ± 0,4	41,0 ± 1,1
50	6,02	8,4	22,3 ± 0,3	42,2 ± 2,6
60	6,00	8,6	23,8 ± 0,2	59,2 ± 1,5

Tabla 14. Hidrólisis con Corolasa a diferentes tiempos.

Corolasa				
Tiempo	pH	° Brix	%GH	Prot. (mg/ml)
0	6,40	4,3	0,0 ± 0,0	37,1 ± 0,9
10	6,22	5,9	11,7 ± 0,2	46,8 ± 2,3
20	6,10	6,6	13,8 ± 0,3	47,3 ± 0,9
30	6,08	7,1	15,0 ± 0,1	47,7 ± 1,3
40	6,00	7,4	15,4 ± 0,1	50,8 ± 1,2
50	5,97	7,6	14,9 ± 0,2	47,5 ± 0,8
60	5,96	7,9	16,7 ± 0,5	48,0 ± 2,4

En la Figura 17, se presenta la grafica del %GH en el tiempo.

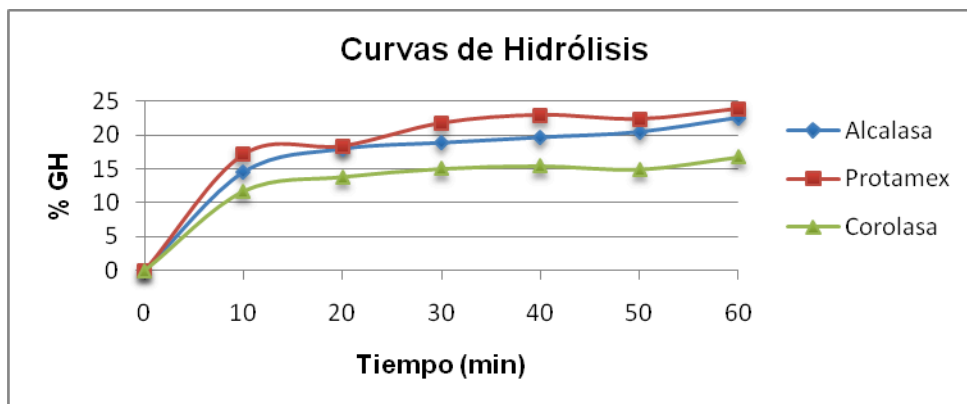


Figura 17. Curvas del porcentaje de hidrólisis para cada enzima a diferentes tiempo.

En la figura 17, se puede observar que la hidrólisis enzimática se aumenta con respecto al tiempo, llegando posteriormente a un equilibrio, en donde aparentemente la hidrólisis de los enlaces peptídicos deja de ocurrir. Protamex fue la enzima que exhibió mayor cantidad de porcentaje de hidrólisis seguido de Alcalasa y Corolasa respectivamente.

3.8. Grados Brix.

Se realizó una medición de los °Brix a la fase soluble, con el fin de poder tener un aproximación rápida a la cantidad de proteínas presentes con respecto al grado de hidrolisis en la fase soluble, sin la necesidad de realizar los protocolos de medición comunes. Para ello se tomaron muestras cada 10 minutos durante 60 minutos de hidrólisis

El resultado mostró una curva similar a la de la hidrólisis, la cual muestra un incremento inicial rápido que a medida que aumenta el tiempo llega a una fase casi constante. En la Figura 18, se presenta la grafica de los °Brix en el tiempo.

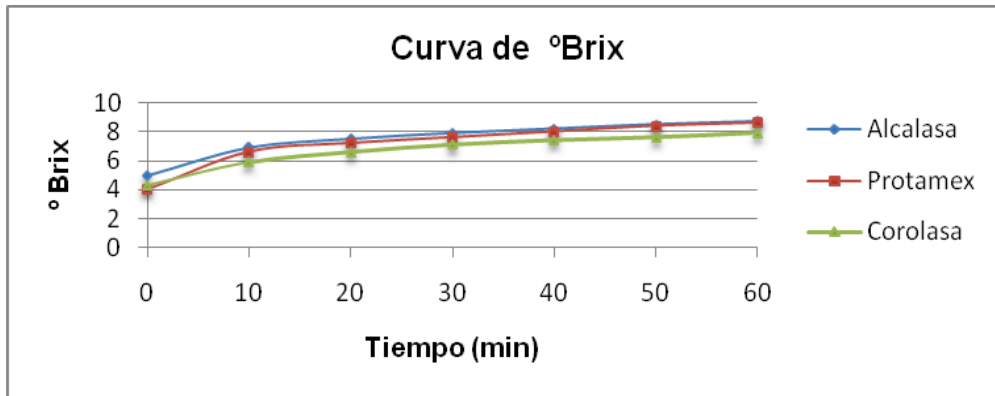


Figura 18. Cambio de los °Brix en el tiempo de hidrólisis.

Con el fin de encontrar una relación entre la cantidad de proteínas y los °Brix, se realizó una curva de medición de los °Brix *versus* proteínas, tomando muestras de un hidrolizado proteico de concentración de proteínas conocida, lo que se puede apreciar en la Figura 19.

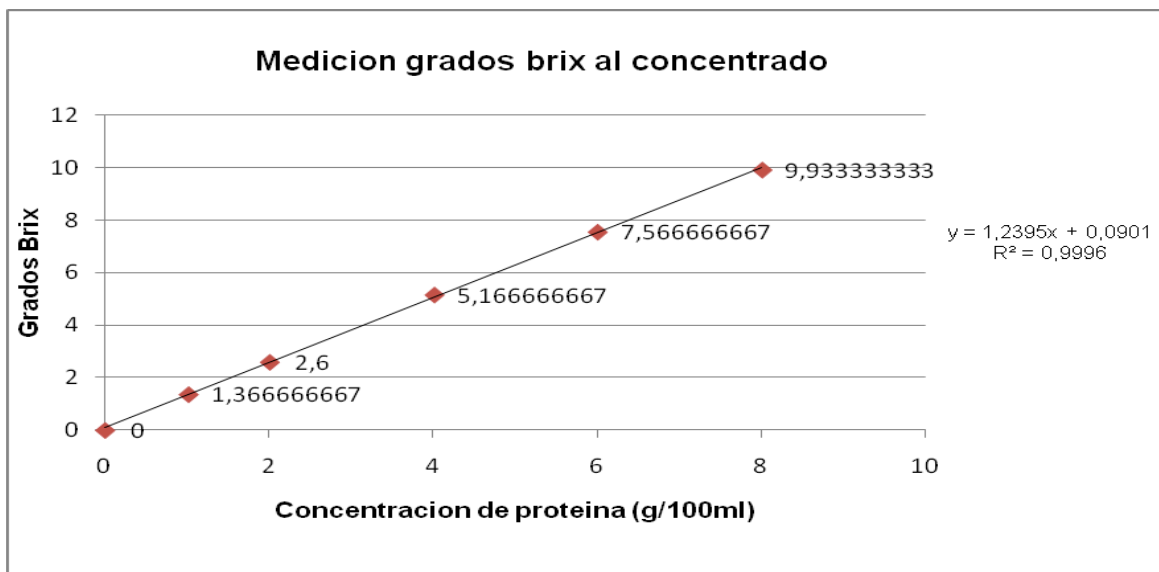


Figura 19. Curva de calibración proteínas *versus* °Brix para un hidrolizado proteico realizado con Corolasa.

Del gráfico se puede concluir que existe una relación lineal entre los grados Brix (en una escala de 0 hasta 10 °Brix) y la cantidad de proteínas presentes en la solución, pero hay que tener en cuenta que el hidrolizado proteico fue producido con Corolasa como enzima.

3.9. Evaluación sensorial

Una vez obtenido los hidrolizados proteicos de cada proceso, se procedió a realizar una evaluación sensorial con un panel de jueces entrenados para detectar el amargor

característico de los hidrolizados proteicos. Además se midió el olor y la aceptabilidad general de las muestras. La finalidad de esta evaluación sensorial es poder determinar qué proceso es más aceptable organolépticamente.

En la Figura 20, se observan los resultados obtenidos de la evaluación sensorial de los productos.

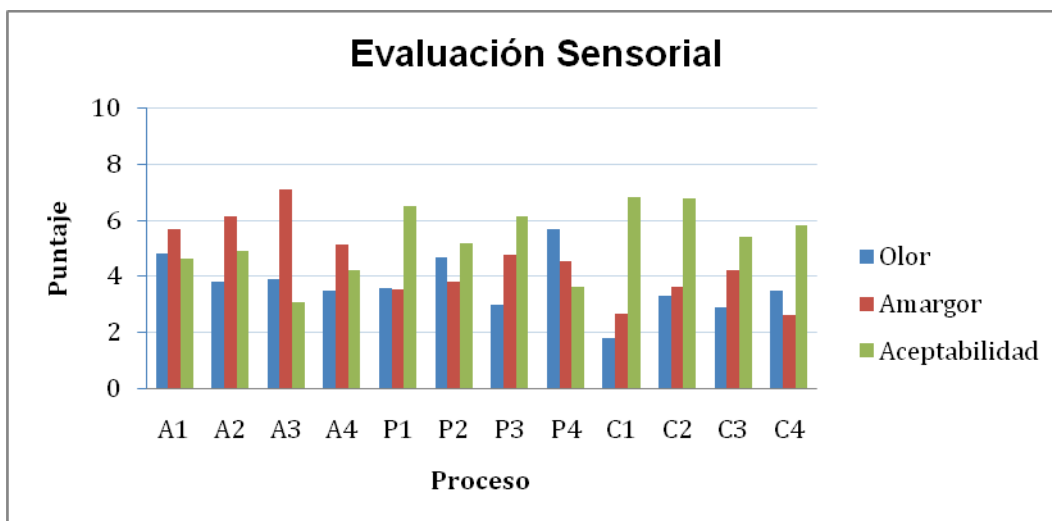


Figura 20. Evaluación sensorial de los hidrolizados proteicos. Donde (A) Alcalasa, (P) Protamex, (C) Corolasa. Procesos (1) sin antioxidante; (2) con TBE como antioxidante; (3) con Hx como antioxidante y (4) con Px como antioxidante.

Del este gráfico se puede concluir que el hidrolizado proteico más aceptado fue el C1, proceso realizado con Corolasa como enzima y sin antioxidante (SA). Lo contrario a este, fue el proceso A3, realizado con Alcalasa como enzima y con Hx como antioxidante. Además es posible ver que, en general, los procesos más aceptados fueron los realizados con Corolasa como enzima, después los con Protamex, y finalmente, los realizados con Alcalasa. Hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en la aceptabilidad del proceso C1, quien fue significativamente más aceptado, y el proceso A3, el cual fue el menos aceptado.

Con respecto a los antioxidantes, existe diferencias no significativas entre ellos. En relación al olor, amargor y aceptabilidad de las muestras, si bien las diferencias no fueron significativas, existe clara evidencia de que la adición de antioxidantes al proceso no mejora la aceptación de las muestras, como se observa en la Figura 21.

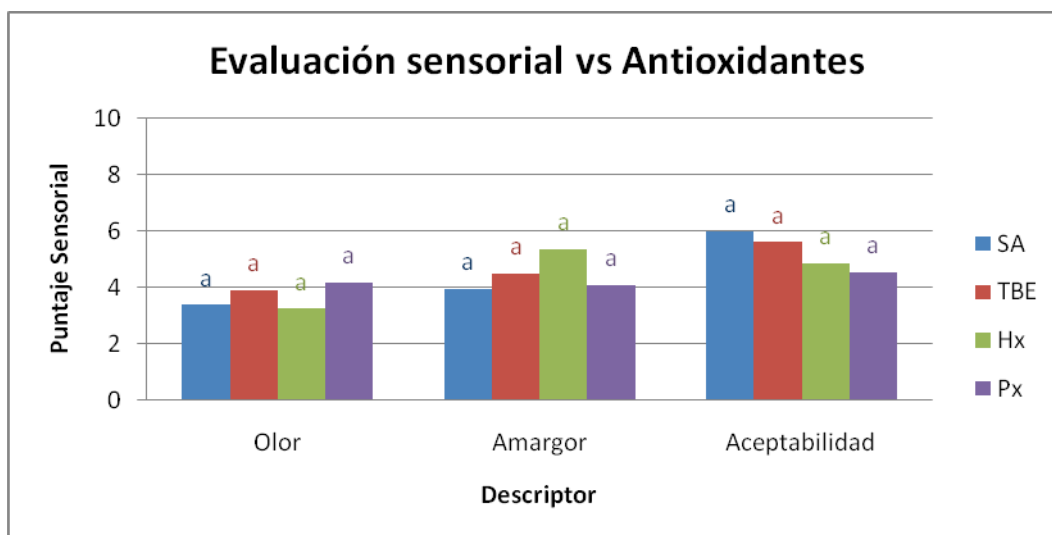


Figura 21. Influencia de los antioxidantes en la evaluación sensorial de los hidrolizados proteicos. Donde (SA) proceso sin antioxidante. Superíndices iguales sobre barras indican que no hay diferencias significativas entre las muestras.

Los resultados indican que el olor fue bajo en general, es decir no había un olor característico a pescado, siendo el más bajo el con el antioxidante Hx y el más alto el con Px. El antioxidante Hx fue el que dio un producto más amargo y el SA fue el que dio con menos amargor, y por último la aceptabilidad fue mejor para los procesos realizados con SA que para los otros tres, es decir que en general fueron más aceptados los procesos que no contenían antioxidantes.

3.10. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Con el fin de obtener un perfil del peso molecular de los péptidos resultantes de la hidrólisis enzimática se realizó un análisis mediante una electroforesis en gel SDS PAGE. Lamentablemente esto no entregó buenos resultados, debido a que no se podían apreciar bandas. Esto se cree que es debido a que los péptidos resultantes son aproximadamente de un promedio de 1000 Dalton (dato obtenido a partir de literatura) y la resolución de la técnica de SDS PAGE que estaba montada solo tiene una resolución de péptidos de hasta aproximadamente 5 KD, con lo que se pudieron apreciar bandas. Además de ese protocolo se trató de realizar una variación de protocolo de H. Schägger (2006), el cual sirve para secuenciar bandas de hasta 0,5 KD, pero lamentablemente ese protocolo no dio resultado con las muestras analizadas.

4. DISCUSIÓN

4.1. Grado de hidrólisis.

El grado de hidrólisis, medido por el porcentaje de hidrólisis, presento diferencias significativas con respecto las diferentes enzimas usadas para cada proceso de hidrólisis enzimática, siendo Protamex la con un mayor porcentaje de hidrólisis, seguido de Alcalasa y Corolasa, respectivamente.

Protamex es una enzima comercial que está constituida por una mezcla de dos enzimas, una serinproteasa con actividad endoproteasa de origen bacteriano que es similar a la Alcalasa, y una metaloproteínasa con actividad exoproteasa de origen bacteriano similar a la Neutrasa (Fuente Novozymes). Esta enzima, al igual que Alcalasa, tiene preferencia por hidrolizar enlaces peptídicos unidos a uno o dos residuos aminoácidos hidrofóbicos contiguos. Como es una mezcla de dos enzimas se puede pensar que su mayor porcentaje de hidrólisis es debido a ello, ya que no solamente corta en el medio de los péptidos, sino que también lo hace en los extremos de la cadena polipeptídica produciendo péptidos pequeños y aminoácidos libres (Raksakuthai y Haard, 2003).

Alcalasa es una serinproteasa de origen bacteriano que tiene preferencia por hidrolizar enlaces peptídicos unidos a uno o dos residuos aminoácidos hidrofóbicos contiguos (Benítez et al., 2008). Esta enzima es una de las más usadas en los procesos de hidrólisis de proteínas de alimentos. Al estar constituida por una sola enzima puede ser que el porcentaje de hidrólisis sea menor que el de Protamex debido a que no posee la actividad exoproteasa, produciendo principalmente péptidos pequeños y en menor medida, tripéptidos, dipéptidos o aminoácidos libres (Kristinsson y Rasco, 2000a).

La enzima Corolasa, también llamada papaína, es una cisteinproteasa de origen vegetal que tiene una gran variedad de sustratos, pues no solamente hidroliza enlaces peptídicos, sino que además hidroliza enlaces de tipo éster, por lo que no es tan especifica como Protamex o Alcalasa (Benítez et al., 2008). Esta enzima no es tan usada para la hidrólisis de proteínas de origen marino, por lo que no es tan eficiente como Alcalasa, pero Corolasa ha dado buenos resultados en el caso del porcentaje de hidrólisis, obteniendo buenos valores de hidrólisis. Como es una enzima de origen vegetal, que no tiene una alta especificidad y que además tiene una gran variedad de sustratos, el porcentaje de hidrólisis es más bajo que las otras dos enzimas debido a estos factores. Además debido a esto probablemente Corolasa

genera péptidos con mayor cantidad de aminoácidos que las otras dos enzimas mencionadas anteriormente.

Los resultados indican que la adición de antioxidantes afecta la actividad de las enzimas, principalmente cuando se agrega TBE y Px. Esto puede deberse a que estos dos antioxidantes contienen quelantes de metales, EDTA en el caso del TBE y ácido fosfórico junto con ácido cítrico en el caso de Px. El problema de la adición de estos antioxidantes es que al quelar metales, estos pueden disminuir la actividad de las enzimas que usan iones metálicos como cofactores, como por ejemplo Protamex, la cual contiene una metaloproteinasa, que funciona con un cofactor metálico, fundamental para su actividad (Benítez et al., 2008). Por otro lado Corolasa, es una enzima que también utiliza metales bivalentes como cofactor enzimático (Raksakuthai y Haard, 2003). Esto se observa en los resultados de porcentaje de hidrólisis en donde se aprecia una disminución principalmente cuando se utilizan esos dos antioxidantes, no así el caso de SA (sin antioxidante) y Hx que es una oleorresina de aceites de romero.

4.2. Índice de Peróxidos.

Para el caso de la oxidación de los lípidos, se usaron antioxidantes como método de protección. Los resultados indicaron claras diferencias entre ellos, en la eficacia contra la protección de la oxidación de los lípidos, dando como antioxidante más eficaz en la protección de los lípidos de salmón a la mezcla compuesta de varios antioxidantes TBE (TBHQ/BHT/EDTA) que protegió completamente a los aceites de la oxidación en un tiempo prolongado de un mes frente a la oxidación.

La diferencia de la eficacia entre los antioxidantes en la protección de los lípidos puede ser debido al origen químico de los antioxidantes, parámetro que influye en la protección. En este caso se habla de un aceite de origen animal, aceite de salmón, por lo cual, Hx no es el antioxidante más adecuado, porque como es una oleorresina de origen vegetal, este principalmente funciona en aceites vegetales y no animales. Para el caso de Px, que está compuesto principalmente de BHA y galato de propilo, se ha observado que su eficacia es mejor en aceites vegetales que animales (Shahidi et al., 1992). Otro factor importante a mencionar es que el galato de propilo es un antioxidante poco indicado para procesos donde las temperaturas son elevadas (Shahidi et al., 1992) , debido a eso pierde efectividad, y si consideramos que en el procesos de hidrólisis enzimática se manejan temperaturas cercanas a los 100°C durante aproximadamente 2 horas esto podría afectar la eficacia del

antioxidante. Para el caso de la mezcla de antioxidantes TBE, se ha visto que el TBHQ es un poderoso antioxidante que tiene buenos resultados en la protección de aceites animales, y que además este puede usarse junto con BHT para potenciar su efecto, dando mejores resultados en el cuidado del aceite (Shahidi et al., 1992). Junto con la mezcla TBHQ/BHT, se decidió adicionar EDTA, debido a que se sabe que los metales bivalentes específicamente el Fe^{2+} tiene efectos negativos sobre la oxidación del aceite (reacción de Fenton) y por lo tanto es necesario quelar estos iones metálicos si se quiere obtener una adecuada protección de los lípidos presentes en el proceso de hidrólisis, en especial cuando se trabaja con materia prima de origen animal, en la que existe una cantidad de sangre, que afecta directamente la oxidación de los aceites.

Es interesante mencionar que, sólo un antioxidante fue eficaz en la protección de los lípidos y que los otros dos antioxidantes fueron similares en los valores obtenidos de oxidación de lípidos, incluso similares al proceso SA, el cual no tiene antioxidante. Estos resultados indican que, en la protección del aceite de salmón los antioxidantes naturales como Hx o comerciales como Px no son muy indicados, incluso innecesarios en el proceso.

Las concentraciones usadas en la protección de los aceites fueron las mismas para los antioxidantes de origen químico, TBE y Px (200 ppm) y el doble para el antioxidante de origen natural, Hx (400 ppm). Todas estas concentraciones están regularizadas según las normas del Reglamento Sanitario de los Alimentos (RSA) y están todas bajo los parámetros máximos permitidos por esta entidad (Ministerio de Salud, 2009).

Es importante mencionar que, los resultados indican que el único aceite para el consumo humano es el que fue producido en el proceso con TBE como antioxidante. En el RSA (Ministerio de Salud, 2009), se indica en el artículo 248 que trata de aceites comestibles, que al momento de producirse, estos no deben tener más de 2,5 mEq O_2 /Kg y durante su vida útil estos no deben exceder los 10 mEq O_2 /Kg. Se puede deducir por medio de los resultados, que TBE fue el único que se mantuvo cercano a los 0 mEq O_2 /Kg, y los otros ya a los 10 días estaban en valores sobre el máximo permitido indicando que no son aptos para consumirlos.

4.3. Proteínas

Los resultados indican que existen diferencias en el porcentaje de proteínas presentes en las muestras de fase soluble y en las muestras de hidrolizados proteico dependiendo de la

enzima usada en el proceso. Claramente Corolasa es la enzima que entrega un porcentaje más alto en cantidad de proteínas, seguido de Alcalasa y por último Protamex, para el caso de la fase soluble y del hidrolizado proteico liofilizado. Estos resultados podrían no ser del todo correctos, debido a que la medición de proteínas se realizó por el método de Biuret, el cual no es el más indicado para los casos de hidrólisis enzimática, ya que su principio se basa en cuantificar por medio de la coordinación de los nitrógenos presentes en los aminoácidos con un ión de cobre (cuatro nitrógenos por cobre) y los aminoácidos libres o dipéptidos no son cuantificados por este método. Si se relaciona este dato con el porcentaje de hidrólisis y con las enzimas usadas podemos deducir que para el caso de Protamex principalmente, que es la enzima que dio un valor mayor de porcentaje de hidrólisis, hay una menor valoración de la cantidad de proteínas presentes en la muestra debido a que esta enzima produce aminoácidos libres y dipéptidos en mayor cantidad que Alcalasa y que Corolasa lo que lleva a una disminución del valor obtenido por Biuret. Esto es comprobable con el hecho de que el análisis de hidrolizados proteicos producidos a nivel piloto (en la planta piloto ubicada en Calbuco) indican que la cantidad de proteínas presentes en las muestras son muy similares entre si, discrepando entre un +/- 2%, con la diferencia que el método de cuantificación fue Kjeldahl.

Probablemente el mejor método de medición de proteínas para los hidrolizados proteicos es el método de Kjeldahl, ya que se basa en la cuantificación del nitrógeno presente en la muestra, y por lo tanto no hay problema en la cuantificación de péptidos muy pequeños o aminoácidos libres, como es común encontrar en hidrolizados proteicos. Previamente a la medición con el método de Biuret, se realizó la medición de proteínas por el método de Bradford, el cual no daba resultados reproducibles para las mismas muestras. Además los resultados no concordaban con las concentraciones esperadas, esto se debió a que el método no es el más indicado, simplemente por el hecho de que no cuantifica péptidos sino que proteínas en donde su colorante hidrofóbico pueda intercalarse en su interior.

Un dato trascendental es el rendimiento del proceso. Corolasa fue la enzima que tenía mayor porcentaje de proteínas seguido de Alcalasa y Protamex, respectivamente, pero en el total de la recuperación no es así, debido a que la cantidad de proteínas recuperadas desde la materia prima es mayor con Protamex seguido de Alcalasa y Corolasa, respectivamente. Esto es porque la recuperación de la fase soluble, en donde está la mayor concentración de péptidos después de la hidrólisis es diferente en cada proceso. Con Protamex se produce una mayor extracción de fase soluble debido a la mejor compactación de la fase insoluble lo

que permite mayor recuperación de la fase soluble, no así con el caso de Alcalasa y principalmente de Corolasa en donde la compactación de la fase insoluble es mucho menor que con Protamex, lo que se traduce en una mayor cantidad de emulsión y menor cantidad de fase soluble recuperada.

4.4. Curvas de hidrólisis y grados Brix

La idea de este análisis fue la de tener parámetros fáciles de medir que puedan ser aplicados a nivel industrial sin tener que requerir de mucho tiempo o equipamiento. Por ejemplo, la cantidad de proteínas fue medida por el método de Biuret, pero a nivel industrial es un proceso costoso y difícil, además de tomar tiempo en realizarlo, por lo mismo se quiso hacer una relación entre los grados Brix que presentaba la fase soluble y la cantidad de proteína presente en la misma lo que permitiría seguir reacciones a nivel industrial en tiempo real. Lo mismo sucede con el grado de hidrólisis, es muy difícil de medir a nivel industrial si no se tiene implementado el método de "pH Stat", por esto es que se trata de tener la relación entre el pH, °Brix, cantidad de proteínas y el grado de hidrolisis, ya que los parámetros como °Brix y pH son fácilmente medibles a nivel industrial.

Las curvas de hidrólisis se caracterizan por una fase inicial rápida, donde un gran número de enlaces peptídicos son "cortados", para luego alcanzar un equilibrio, donde aparentemente no hay mas ruptura de enlaces peptídicos, probablemente debido a una inhibición por producto de la enzima junto con otros factores tales como la propia degradación de la enzima lo que lleva al estado constante de porcentaje de hidrólisis.

A medida que se hidrolizan los enlaces peptídicos se forman nuevos grupos NH_2 y COOH , los cuales pueden estar ionizados dependiendo del pH. Al pH de la hidrólisis, levemente mas bajo que 7, el grupo carboxilo debería estar ionizado como COO^- y el grupo amino debería estar parcialmente ionizado como NH_3^+ , por lo tanto, se produce una liberación de un H^+ al medio por parte del grupo carboxilo, lo cual va produciendo la disminución del pH de la hidrolisis.

La cantidad de proteínas encontradas en la fase soluble aumenta rápidamente en los primeros minutos de hidrólisis, hasta mas o menos los 30 primeros minutos de reacción, donde después de ello el aumento es menor. Es probable que la cantidad de proteínas encontradas en la fase soluble durante el tiempo de hidrolisis es similar en cuanto a la concentración, pero no lo es cuando hablamos de tamaños moleculares. Seguramente las

proteínas obtenidas en los primeros minutos de hidrólisis son de un mayor tamaño y peso molecular a las que encontramos en estados más avanzados de ella, lo que es coherente con el aumento del porcentaje de hidrólisis durante el tiempo.

En el caso de los °Brix, éstos se utilizaron para hacer una relación entre la cantidad de proteínas obtenidas y los °Brix medidos en la fase soluble. Esto es debido a que la medición de proteínas es un proceso lento que requiere tiempo y equipamiento, no así la medición de los °Brix que pueden ser medido fácilmente y de una manera rápida, la cual puede ser llevada fácilmente a terreno. El refractómetro, usado para medir los °Brix, mide la sacarosa en solución y no las proteínas, por lo que se trató de encontrar una relación entre estos parámetros.

Si analizamos los resultados de los °Brix en el tiempo, no hay una relación totalmente clara entre la cantidad de proteínas y los °Brix en general. Debido a que las enzimas difieren en su mecanismo de corte, se necesitaría una escala de °Brix particular para cada enzima, ya que el índice de refracción debe ser distinto para aminoácidos libres, di o tripéptidos y polipéptidos. Lo anterior mencionado puede ser corroborado por el gráfico de la curva de calibración y cantidad de proteína °Brix (Figura 19), en donde sí se encuentra una relación lineal de los °Brix y la cantidad de proteínas presentes en un hidrolizado proteico realizado específicamente con Corolasa como enzima.

4.5. Evaluación sensorial

Se sabe que el gran problema a nivel organoléptico de los hidrolizados proteicos, de origen marino y de otras especies, es principalmente el amargor que va asociado a ellos, esto se cree que es debido a la exposición de los residuos hidrofóbicos que están presentes en el interior de las proteínas intactas y que por medio de la hidrólisis son liberados al medio (Kristinsson y Rasco, 2000a).

Otro de los problemas asociados a la hidrólisis principalmente de pescados grasos en general, es su intenso olor a pescado, lo cual es producido principalmente por los lípidos presentes en las muestras (Hoyle y Merritt, 1994).

Para la evaluación sensorial se midieron tres parámetros; amargor, olor y aceptabilidad de las muestras. Los resultados de este análisis sensorial sirven para sacar varias conclusiones, en donde podemos asociar parámetros tales como el porcentaje de hidrólisis, el tipo de

enzima usada en la hidrólisis y la oxidación de los lípidos presentes en la muestra con la calidad organoléptica de ellas.

4.5.1. Evaluación sensorial y porcentaje de hidrólisis

Mucho se ha dicho acerca de la relación entre el porcentaje de hidrólisis y la calidad organoléptica del hidrolizado proteico de origen marino. Es ampliamente aceptado que el amargor de los hidrolizados es debido a los aminoácidos hidrofóbicos de las proteínas. Esto es debido a que como se mencionó anteriormente, el proceso de hidrólisis libera aminoácidos hidrofóbicos que están al interior de las proteínas hacia el medio, lo que produce una detección del sabor amargo. Se cree que a medida que aumenta el porcentaje de hidrólisis, es más probable que se produzca un producto más amargo, ya que hay más probabilidad de liberación de péptidos que tienen en sus cadenas los aminoácidos hidrofóbicos (Kristinsson y Rasco, 2000a), pero revisando los resultados obtenidos en esta tesis podemos ver que no necesariamente existe tal relación, ya que para el caso de Protamex el porcentaje de hidrólisis fue en promedio de 23,9, significativamente ($p < 0,05$) más alto que el de Alcalasa que fue en promedio 21,5. Si esto lo asociamos con los resultados de la evaluación sensorial que indican que el producto más aceptado entre estos dos fue Protamex, podemos concluir que no existe una relación estricta entre el amargor y el porcentaje de hidrólisis.

4.5.2.. Evaluación sensorial y Enzimas

No solamente es importante el porcentaje de hidrólisis, ya que como se mencionó antes no está directamente implicado en el amargor, para el caso de esta tesis fue más importante la elección de la enzima para la hidrólisis en el tema de la aceptabilidad de los hidrolizados. Se ha dicho que los aminoácidos hidrofóbicos son los causantes del amargor, principalmente cuando estos están dentro de las cadenas polipeptídicas, pero se cree que estos pueden dejar de ser amargos cuando adquieren carga, es decir, cuando están como aminoácidos libres o cuando están en los extremos de las cadenas polipeptídicas, porque están en un estado ionizado. Es por eso que, se cree que la mezcla de enzimas con actividad endoproteasa y exoproteasa en un proceso de hidrólisis enzimática puede dar productos menos amargos incluso a altos porcentaje de hidrólisis. Este dato es totalmente comprobable cuando revisamos el caso mencionado antes. Protamex, una mezcla enzimática de endoproteasas y exoproteasas, produce productos menos amargos y más aceptables que Alcalasa, que es solo de actividad endoproteasa, incluso teniendo mayor porcentaje de

hidrólisis. Por otro lado, Corolasa es un caso más particular, ya que esta enzima produce productos con un porcentaje de hidrólisis significativamente menor que las otras dos enzimas en uso. Esta enzima fue la que dio como resultados los mejores productos organolépticamente hablando, fueron los más aceptados, los que tenían menor amargor y menos olor. Este resultado puede ser debido a que como existe un menor porcentaje de hidrólisis, los aminoácidos hidrofóbicos no “alcanzaron” a liberarse totalmente al medio o lo hicieron en menor medida en comparación con las otras dos enzimas, dando como resultados productos menos amargos y mejor aceptados en general.

Como conclusión podemos decir que es más importante el tipo de enzima y cómo ésta corta las proteínas, ya que por los resultados podemos comprobar que en la aceptabilidad esto influye más que el porcentaje de hidrólisis. De todas maneras no podemos enfocarnos solamente en eso, se debe encontrar una relación de los dos parámetros para obtener un proceso optimizado y con buenos resultados. El porcentaje de hidrólisis si es importante en la aceptabilidad del producto final, cuando este solo se hidroliza con la misma enzima, es decir si solamente se hubiera utilizado una sola enzima para la hidrólisis, probablemente la única forma de saber cuándo el producto es amargo o no, es con el porcentaje de hidrólisis.

4.5.3. Evaluación sensorial y oxidación de lípidos

Se ha determinado que la oxidación de los lípidos en los alimentos trae como consecuencias pérdida de sabor, olores indeseados y hasta productos que pueden llegar a ser nocivos para la salud humana (Yu et al., 2006). Es por ello que, el adecuado cuidado de los lípidos presentes en los alimentos es un tema fundamental si se quiere tener un producto de alto valor nutricional, que sea fácilmente transportado y almacenado sin causar daño. Debido a esto, el uso de antioxidantes es algo común en los alimentos (Valenzuela et al., 2003; Gramza y Korczak, 2005)

Los lípidos, además de afectar la calidad alimenticia, también tienen una influencia directa en el olor de los hidrolizados, ya que se ha visto que hidrolizados donde previamente se ha extraído casi la totalidad de los lípidos por extracción con solvente no presentan ningún tipo de olor a pescado (Kristinsson y Rasco, 2000a).

En el proceso de hidrólisis, los productos obtenidos tienen un porcentaje de materia grasa cercano a un 2 %, el cual se piensa que es suficiente como para causar olor a pescado y un sabor indeseado si es que estos lípidos no están bien cuidados. Se ha visto que este

problema puede afectar a alimentos con porcentajes tan bajos como lo son entre 0,5 y 1% (Valenzuela et al., 2003).

Contrariamente a lo esperado, los resultados indican que la presencia de antioxidantes en el proceso no produjo una mejora en la aceptación, es más, la aceptación fue mayor para el caso del proceso sin antioxidante presente. Entre los tres procesos con antioxidante, el más aceptado en general fue el realizado con TBE, el cual además fue el que protegió más eficientemente los lípidos de la oxidación. Estos resultados podría indicar que dentro de los procesos que tienen antioxidantes presentes, el más adecuado para la aceptación del producto es el más eficaz en la estabilidad de los lípidos.

Estos resultados se pueden deber a que quizás la cantidad de lípidos presentes en la muestra son insuficientes como para afectar la calidad organoléptica del producto final. El uso de antioxidantes podría ser más una “molestia” que una ayuda para la aceptación del producto, ya que es claro que los resultados indican mejor aceptación de los productos sin antioxidantes en el procesos que con antioxidantes en el proceso, además aumenta el costo del producto final.

De los resultados se extrae que la adición de antioxidantes no es de vital importancia al momento de enfocarse en un producto final con un alto porcentaje de proteínas, pero si la atención cae en el aceite producido como un co-producto de la hidrólisis, habría que hacer un balance entre la cantidad de antioxidante agregado al proceso y la calidad organoléptica de los hidrolizados. Un proceso adecuado sería el que produzca hidrolizados con buenas características organolépticas y aceites de alta calidad. Esto último se puede lograr con la utilización de un antioxidante como TBE en el proceso, el cual es eficaz en la protección de aceites animales y organolépticamente más aceptado que los otros antioxidantes presentes, lo que permite obtener dos productos con buena calidad alimenticia, organolépticamente aceptado y con su valor nutricional intacto.

5. CONCLUSIONES

- Los diferentes productos hidrolizados mostraron aceptación a través de su evaluación sensorial.
- Se encontró una relación entre la cantidad de proteínas y los grados Brix que es particular para cada enzima elegida como proteasa en la hidrólisis, y no como una generalidad del proceso.
- No se pudo estimar un perfil del peso molecular de los diferentes hidrolizados proteicos, ya que las técnicas electroforéticas montadas no fueron lo suficientemente adecuadas para ello.
- Los antioxidantes empleados mostraron ser eficaces en la protección de los lípidos obtenidos del proceso de hidrólisis en el tiempo, demostrando que su eficacia depende de su naturaleza química y de la procedencia del lípido.
- La adición de antioxidantes no mejora las propiedades organolépticas del producto final, debido a que en general el producto es menos aceptado cuando un antioxidante es agregado al proceso.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahn, J., Grün, I., y Mustapha, A. 2007. "Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef," *Food microbiology*, vol. 24, pp. 7-14.
2. Aspino, S. 2005. "Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera," *Process Biochemistry*, vol. 40, pp. 1957-1966.
3. Aurrekoetxea, G., y Pereira, M. 2002. "Aprovechamiento de recursos pesqueros infrautilizados para la obtención de alimentos mejorados para el cultivo de peces," *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, vol. 18, pp. 87-93.
4. Bacal, C. 2001. "Control de Oxidación en Ingredientes para alimentos de mascotas," *Grasas y subproductos animales*, vol. 15, pp. 422-427.
5. Benítez, R., Ibarz, A., y Pagan, J. 2008. "Hidrolizados de proteína : procesos y aplicaciones," *Acta bioquímica clínica Latinoamérica*, vol. 42, pp. 227-237.
6. Bozimowsky, D., Artiss, J.D., y Zak, B. 1982. "Spectrophotometric comparison of several reactions used for cerebrospinal fluid protein determinations," *Microchemical Journal*, vol. 28, pp. 285-293.
7. Chen, Y., y Jaczynski, J. 2007. "Protein recovery from rainbow trout processing byproducts via isoelectric solubilization/precipitation and its gelation properties as affected by Functional Additives" *Journal Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, pp. 9079-9088.
8. Díaz-Acosta, A., y Membrillo-Hernández, J.. 2006. "Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos," *Revista Española Ciencias Químicas Biológicas*, vol. 9, pp. 34-44.
9. Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., y Yang, H. 2008. "Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp," *Food Chemistry*, vol. 107, pp. 1485-1493.
10. FitzGerald, R., y O'Cuinn, G. 2006. "Enzymatic debittering of food protein hydrolysates," *Biotechnology advances*, vol. 24, pp. 234-237.
11. Fritsche, K., y Johnston, P. 1988. "Rapid autoxidation of fish oil in diets without added antioxidants," *Journal of Nutrition*, vol. 118, pp. 425-426.
12. Garcia, H. 2000. "Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia," *Universo Diagnóstico*, vol. 1(2), pp. 31-41.
13. Gonzalez, M., Gray, J., Schemmel, R., y Dugan, L. 1992. "Lipid peroxidation products are elevated in fish oil diets even in the presence of added antioxidants," *Journal of nutrition*, vol. 122, pp. 2190-2195.
14. González-Torres, M., Betancourt-Rule, M., y Ortiz, R. 2000. "Daño oxidativo y antioxidantes," *Bioquímica*, vol. 25, pp. 3-9.
15. Gramza, A., y Korczak, J. 2005. "Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 16, pp. 351-358.
16. Guadix, A., Guadix, E., Páez-Dueñas, M., González-Tello, P., y Camacho, F. 2000. "Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas," *Ars. Pharmaceutica*, vol. 40, pp. 79-89.
17. Hoyle, N. T., y Merritt, J. H. 1994. "Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*)," *Journal of Food Science*, vol. 59, pp. 76-80.
18. Instituto de fomento pesquero, sección economía. 2009. "Boletín de información rubro salmónidos.," *Boletín de exportaciones pesqueras de Chile*, año 11, número 12.

19. Instituto Nacional de Normalización. 2002. "Aceite de pescado – Determinación de índice de peróxido," NCh 2758. Of.2002. Primera Edición.
20. Kristinsson, H.G. y Rasco,B.A. 2000a. "Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties," *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 40, pp. 43-81.
21. Kristinsson, H.G., y Rasco,B.A. 2000b. "Biochemical and functional properties of Atlantic salmon muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases.," *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 48, pp. 657-666.
22. Liaset, B., Julshamn, K., y Espe, M. 2003. "Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzyme hydrolysis of salmon frames with Protamex," *Process Biochemistry*, vol.38, pp. 1747-1759.
23. Liceaga-Gesualdo, A., y Li-Chan, E. 1999."Functional properties of fish protein hydrolysate from herring," *Journal of food Science*, vol. 64, pp. 1000-1004.
24. Mendis, E., Rajapakse, N., y Kim, S. 2005. "Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate," *Journal Agric. Food Chemistry*, vol. 53, pp. 581-587.
25. Palić, A., y Lučan, Ž. 1995. "Antioxidative Effect of 'Herbalox' on Edible Oils," *Lipid/Fett*, vol. 97, pp. 379-381.
26. Republica de Chile, Ministerio de Salud. 2009. "Reglamento sanitario de los alimentos," DTO N° 977/96.
27. Raksakuthai, R. y Haard, N. 2003. "Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food," *Critical review in food science and nutrition*, vol. 34, pp. 401-455
28. Sant, L., y Mancini-Filho, J. 2000. "Influence of the addition of antioxidants in vivo on the fatty acid composition of fish fillets," *Food chemistry*, vol. 68, pp. 175-178.
29. Sathivel, S., and Smiley, S. 2005. "Functional and nutritional properties of red salmon enzymatic hydrolysates," *Journal of Food*, vol. 70, pp. 401-406.
30. Schägger, H. 2006. "Tricine-SDS-PAGE.," *Nature protocols*, vol. 1, pp. 16-22.
31. Seo, W.H., Lee,H.G., y Baek,H.H. 2008. "Evaluation of bitterness in enzymatic hydrolysates of soy protein isolate by taste dilution analysis," *Journal of food science*, vol. 73, pp. 41-46.
32. Shahidi, F., Janitha, P.K., y Wanasundara, P.D. 1992. "Phenolic antioxidants," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 32, pp. 67-103.
33. Taylor, W. 1957. "Formol titration: an evaluation of its various modifications," *The Analyst*, vol. 48, pp. 488-498.
34. Tokur, B., y Korkmaz, K. 2007. "The effects of an iron-catalyzed oxidation system on lipids and proteins of dark muscle fish," *Food Chemistry*, vol. 104, pp. 754-760.
35. Valenzuela, A., Sanhueza, J., y Nieto,S. 2003. "Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits," *Grasas y aceites*, vol. 104, pp. 754-760.
36. Vioque, J. y Millán,F. 2005. "Los hidrolizados proteicos en alimentación: Suplementos alimenticios de gran calidad funcional y nutricional," *Agro CSIC*, pp. 2-8.
37. Wanasundara, U., y Shahidi,F. 1998. "Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils," *Food Chemistry*, vol. 63, pp. 335-342.
38. Wittig de Penna, Emma. 2001. "Evaluacion sensorial. Una metodología actual para tecnología de alimentos," Edicion digital reproducida con autorización del autor.
39. Yu, H.-hua, Liu, X., Xing, R., Liu, S., Guo, Z., Wang, P., Li, C., y Li, P. 2006. "In vitro determination of antioxidant activity of proteins from jellyfish," *Food Chemistry*, vol. 95, pp. 123-130.

7. ANEXOS

Anexo 1. Perfiles aminoacídicos de los hidrolizados proteicos.

Tabla 15. Perfil aminoacídico del hidrolizado proteico realizado con Alcalasa.

Amino ácidos (g/100g) (*AA Esenciales)				
		Alcalasa	Protamex	Corolasa
*Histidina	*His	2,2	2,29	1,43
*Arginina	*Arg	7,2	8,56	8,69
*Treonina	*Thr	2,9	2,6	3,05
*Valina	*Val	3,3	3,12	3,11
*Metionina	*Met	2,1	2,1	1,98
*Isoleucina	*Ile	2,3	3,48	2,18
*Leucina	*Leu	4,2	4,85	4,27
*Fenilalanina	*Phe	2,3	2,09	1,89
*Lisina	*Lys	6,4	5,59	6,31
Acido Aspártico	Asp	7,9	6,98	7,43
Acido Glutámico	Glu	9,8	9,95	10,12
Hidroxiprolina	OH-Pro	3,7	3,37	3,86
Serina	Ser	3,4	3,75	3,87
Glicina	Gly	12,3	13,6	12,9
Taurina	Tau	1,6	1,27	0,81
Alanina	Ala	5,9	6,01	6,94
Prolina	Pro	6,8	6,58	6,9
Tirosina	Tyr	1,8	1,23	1,31
*Triptofano	*Trp	0,3	0,26	0,39
Cisteína	Cys	0,46	0,38	0,44

Anexo 2. Fotografías de los hidrolizados proteicos

A continuación, en la Figura 22, se pueden observar las fotografías de los hidrolizados proteicos. El número indica el proceso, la fila superior es con Alcalasa la de al medio es con Protamex y la última de con Corolasa como enzima.

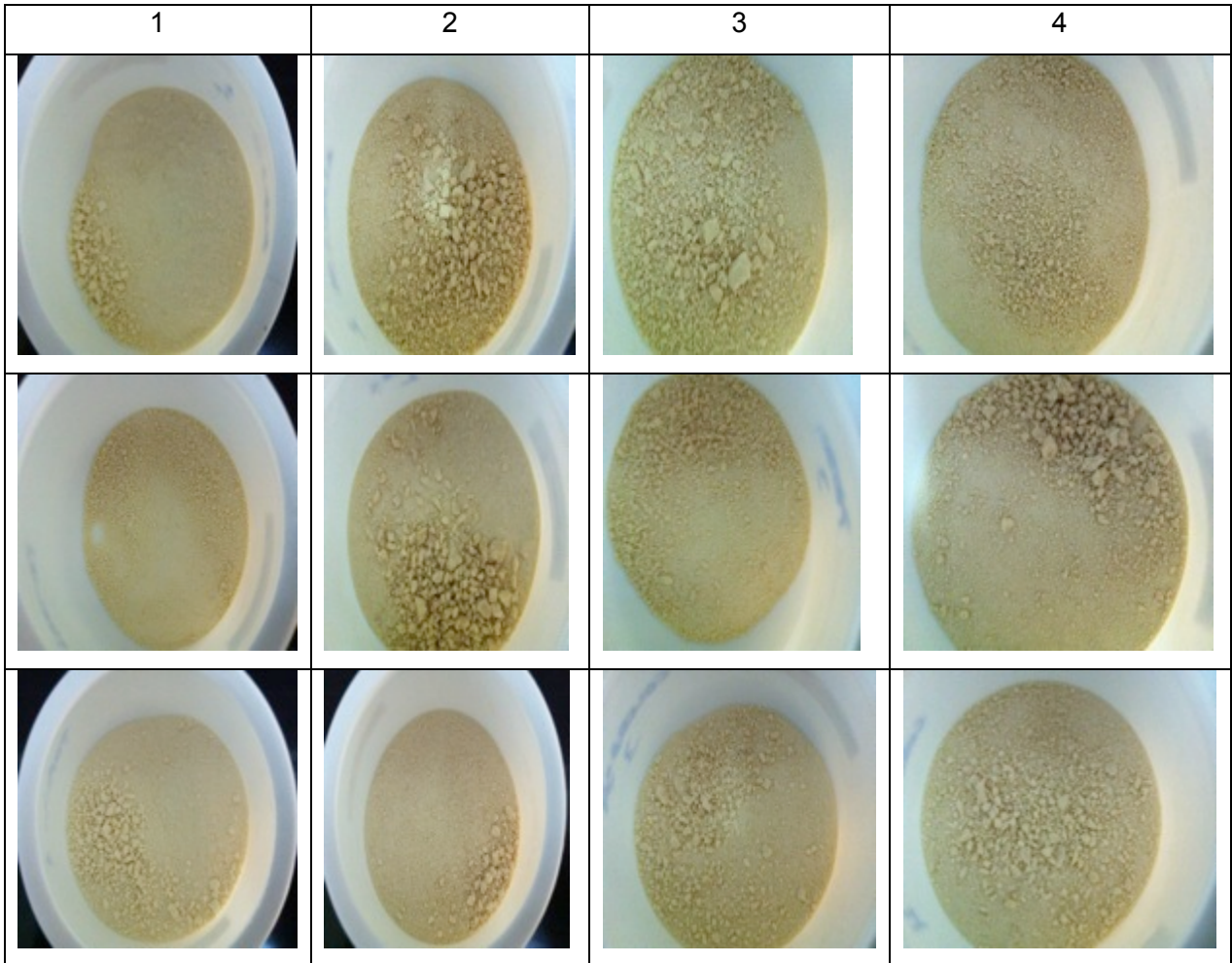


Figura 22. Fotografías de los hidrolizados proteicos

Anexo 3. Materia prima.

A continuación, en la Figura 23, se observa una fotografía de los subproductos usados para los procesos de hidrólisis.



Figura 23. Fotografía de cabezas de salmón.