

03062

19

2 ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
UACPyP del CCH



**"DESARROLLO DE UN PROCESO
ENZIMATICO PARA LA OBTENCION
DE HIDROLIZADOS DE PROTEINA
DE PESCADO DE DESECHO".**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A :
Q.F.B. GERARDO RIVERA MUROZ

MEXICO
1990

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Página
I) INTRODUCCION.	1
II) ANTECEDENTES.	4
III) MATERIAL Y METODOS.	8
Reactivos:	
Reactivos Analíticos.	8
Reactivos Industriales.	8
Sustratos.	8
Preparaciones proteolíticas de uso industrial.	8
Determinación de la actividad proteolítica sobre caseína.	9
Determinación del nitrógeno soluble en TCA.	9
Sistema de hidrólisis en matraz.	9
Sistema de hidrólisis en reactor de 5 y 14 litros.	9
Índice de contaminación.	10
Balances de materiales.	10
Análisis Bromatológico.	10
Determinación de humedad.	10
Determinación de cenizas.	11
Determinación de proteínas.	11
Determinación de grasa cruda.	11
Filtración en columnas de saphadex G-15.	12
Determinación del perfil de aminoácidos.	12
Determinación de triptófano.	12
Solubilidad del hidrolizado de músculo de pescado.	13
IV) RESULTADOS Y DISCUSION.	14
Selección de materias primas:	14
Preparaciones proteolíticas crudas.	14
Sustratos.	14
Efecto de los parámetros fisicoquímicos sobre la hidrólisis de proteína de músculo de pescado.	16
Efecto de la temperatura sobre la velocidad de hidrólisis.	16
Efecto del pH sobre la velocidad de hidrólisis.	16
Efecto de la molaridad del buffer usado en el sistema de hidrólisis.	17
Efecto de la fuerza iónica del sistema sobre la velocidad de hidrólisis.	17
Efecto de los parámetros estequiométricos sobre la hidrólisis de proteína de músculo de pescado.	18
Efecto de la concentración de sustrato.	18
Efecto de la concentración de enzima.	19

Efecto de los pretratamientos del sustrato sobre la hidrólisis de proteínas de músculo de pescado.	19
Efecto del pretratamiento térmico.	19
Efecto del secado.	20
Efecto del desengrasado.	20
Efecto de las condiciones de operación sobre la hidrólisis de proteínas de músculo de pescado.	20
Efecto de la agitación.	21
Hidrólisis de la proteína de músculo de pescado en reactor de 5 litros.	21
Hidrólisis de la proteína de músculo de pescado en reactor de 14 litros.	22
Diagrama de flujo propuesto.	22
Balanza de materiales del proceso propuesto nivel de 14 litros.	23
Caracterización del hidrolizado de proteína de músculo de pescado.	23
Relación porcentual de pesos moleculares.	23
Perfil de aminoácidos.	24
Solubilidad del hidrolizado.	24
Hidrólisis de la fauna de acompañamiento con la preparación "BR" en condiciones optimizadas.	24
V) CONCLUSIONES.	26
VI) RECOMENDACIONES.	27
VII) REFERENCIAS.	28

INTRODUCCION:

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 1963) estima que para el año 2000 el ser humano requerirá de 100 millones de toneladas anuales de peces y mariscos para su consumo. La utilización del material biológico capturado por las redes durante la pesca por arrastre del camarón conocido como fauna de acompañamiento, basura, morralla o by-catch, mismo que está constituido en un 80.00 % de pescado, el cual es una alternativa barata y abundante para cubrir parte de esta demanda.

Cálculos globales indican un volumen potencial de captura mundial de este material, de entre 5 y 16 millones de toneladas al año (Yañez-Arancibia, 1984) cifra que lo coloca como el recurso pesquero con el potencial más alto para ser utilizado como materia prima en la elaboración de alimentos proteicos. Aunque no se conoce con exactitud el volumen capturado en la actualidad, se calcula que se descartan entre 3 y 5 millones de toneladas al año de fauna de acompañamiento de camarón.

En este sentido, México cuenta con 10 000 km de litorales, una plataforma continental de 500 000 kilómetros cuadrados, 1.5 millones de hectáreas de lagunas costeras, y una riqueza ictológica extraordinaria (Ortiz, 1975). Por ello el volumen de captura de "fauna de acompañamiento" en la pesca del camarón en las costas Mexicanas representa un volumen potencial de 628 333 toneladas al año, de las cuales 336 333 toneladas se obtendrían en el Golfo de México, y las restantes 292 000 toneladas en el Golfo de California y la costa del Pacífico Central Mexicano, siendo la Zona de Campeche y el Golfo de California las zonas que aportarían la mayor cantidad de este material, (Figura 1).

Bien sabido es el alto valor nutritivo del pescado, debido a que es una fuente de proteínas de buena calidad por su alto contenido de aminoácidos esenciales. Ya que la fauna de acompañamiento está básicamente constituida por pescado, es de esperarse que su valor nutritivo sea similar al de las especies pesqueras comercializadas actualmente.

En la Tabla I se presenta la composición bromatológica de algunas especies de pescado presentes en la fauna de acompañamiento y como puede observarse el contenido de proteína entre otras fluctúa alrededor del 18.0 % del peso fresco (Chavéz, 1972). El contenido de aminoácidos esenciales del pescado se compara con el de otras fuentes proteicas de origen animal o vegetal en la Tabla II, por el contenido de aminoácidos esenciales se hace evidente que el valor nutritivo del mismo es similar, y en algunos casos superior, al de los estándares internacionales.

A pesar de que la fauna de acompañamiento podría satisfacer la demanda de proteína para consumo humano y animal, en la actualidad, solamente en algunas zonas del litoral mexicano se está industrializando parte de este material, para la producción de harina de pescado.

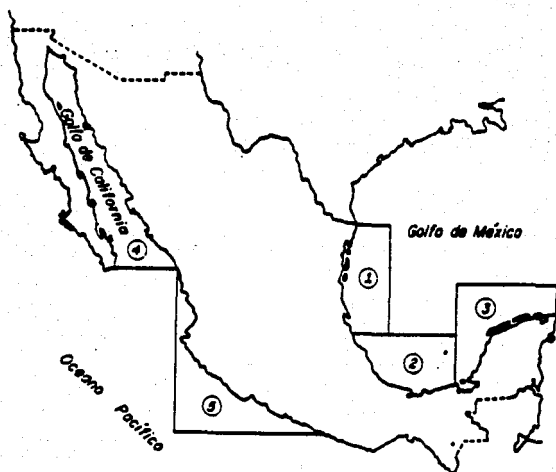


Figura 1) Estimación del potencial pesquero de la fauna de acompañamiento del camarón por áreas productoras en el litoral mexicano.

Zona	Proporción FAC/camarón	Desembarco de camarón Ton/año	FAC Ton/año
1	12:1	7361	88332
2	15:1	4381	65715
3	13:1	14022	182286
4	7:1	27420	192000
5	10:1	10000	100000
TOTAL	11:1	63184	628333

Zonas 1 a 3 según Yáñez-Arancibia, A. y Sánchez-Gil, P. (1984).

Zona 4 según Vander Heiden, A.M. (1985).

Zona 5 según Amezcua-Lisares, F. (1985).

TABLA I
ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE ALGUNAS ESPECIES DE PESCADO

ESPECIES DE PESCADO	PROTEINAS	LIPIDOS	CENIZAS	AGUA
ARENQUE	18.0	8.0	2.0	72.0
BAGRE (<i>Aphos porosus</i>)	17.5	2.7	2.3	77.7
BLANQUILLO (<i>Protilus jugularis</i>)	12.2	2.7	2.9	82.5
BONITO	23.5	4.2	1.6	70.7
MACARELA (<i>Pseudotophorus porusans</i>)	18.0	5.5	1.6	75.0
MERLUZA (<i>Physiculus marginatus</i>)	17.0	2.0	3.0	79.0
MERO	18.7	0.7	1.2	79.4
ROBALO	20.0	1.0	1.0	78.0
SIERRA	21.8	4.6	1.3	72.3

Referencias: (FAO, DT 142; Durand, 1976; Tarty 1979)

TABLA II

**COMPARACION DEL PERFIL DE AMINOACIDOS DE LA PROTEINA DE
DIFERENTES ESPECIES DE PESCADO PRESENTES EN LA FAUNA DE
ACOMPANAMIENTO CON EL DE ESTANDARES INTERNACIONALES.**

AMINOACIDOS	FAO	CARREINA	HUEVO	A	B	C
LEUCINA	42	81	72	79	159	61
LEUCINA	48	101	88	94	146	52
ISOLEUCINA	42	66	57	55	83	43
METIONINA	22	31	38	27	60	09
FENILALANINA	28	54	57	42	75	30
TREONINA	28	43	53	57	91	31
TRIPTOFANO	1.4	1.3	1.3		/ /	09
VALINA	42	74	88	78	108	29

- A) Macarela ref. Shing Shen lee, 1981.
 B) Anchoveta ref. Gildberg, 1984.
 C) Merluza ref. Tarky, 1977.

Si se analizan los volúmenes de captura de camarón y fauna de acompañamiento reportados por el Departamento de pesca de México para los años 1978, 1980 y 1981 y se calcula el volumen potencial de fauna de acompañamiento tomando la relación más baja de camarón/fauna de acompañamiento, 7:1, reportada por Chávez en 1972, encontraremos que así, el aprovechamiento promedio es bajo y representa solamente el 2.6% (Tabla III), dicho volumen está destinado a la elaboración de harina de pescado, producto que está limitado al uso en la formulación de alimentos para animales, ya que no posee las características funcionales y organolépticas necesarias, para ser incorporada en la alimentación humana, o en la manufactura de otro tipo de productos en los que se usan materiales proteicos, ya que no es fácilmente soluble ni dispersable en agua y además posee un olor desagradable.

A nivel internacional, al igual que en México, se han planteado alternativas para la industrialización de la fauna de acompañamiento del camarón, que permitan optimizar el aprovechamiento de este recurso pesquero para consumo humano directo. En nuestro país se pueden señalar los intentos de Productos Pesqueros Mexicanos, S.A. de C.V. (1979) para introducir en el mercado nacional pulpa de pescado para consumo inmediato, también se han intentado producir pastas de pescado en las que se usa como materia prima principal pulpa de pescado, a la que se le adiciona saponificadores y aglutinantes, igualmente se ha intentado introducir pastel de pescado, salchichas de pescado, jamón de pescado, marinadas etc. (Bojorquez, L., 1979), sin obtener el éxito esperado, al encontrar como barrera el rechazo de estos productos por parte del consumidor, debido a los hábitos de alimentación de la población.

Tomando en consideración lo antes expuesto, es contradictorio el hecho de que este material marino, abundante y de alto valor nutritivo, no haya sido industrializado de manera intensiva, sin embargo esto es fácil de explicar si se toma en consideración que el producto obtenido, la harina de pescado, posee un bajo valor agregado, y por lo tanto no es posible pagar mejor la fauna de acompañamiento para que los pescadores se interesen en llevarla en las bodegas de sus barcos hasta las plantas de procesamiento.

Teniendo en mente que un mejor aprovechamiento de la fauna de acompañamiento podría contribuir en abatir el déficit de proteínas actual, y tomando en cuenta los grandes volúmenes de captura de este material, el alto valor nutritivo del mismo, así como la problemática económica en que se encuentra nuestro país, adquieren relevancia los estudios tendientes a buscar otras alternativas para el aprovechamiento de este recurso, a través del desarrollo básico de tecnologías que permitan obtener un producto de mayor valor agregado, y con una gama de aplicaciones más amplia y novedosa, que los intentados hasta ahora, y que en conjunto permitan evadir los problemas planteados.

Una posibilidad atractiva es el obtener un producto con las cualidades nutritivas, organolépticas y funcionales necesarias para ser incorporado en alimentos tradicionalmente consumidos por el ser humano, o que pudiera ser utilizado en la formulación de sustitutos

TABLA III

VOLUMEN DE PRODUCCION DE CAMARON Y FAUNA DE ACOMPAÑAMIENTO EN LA REPUBLICA MEXICANA.

AÑO	CAPTURA DE CAMARON	FAUNA DE ACOMPAÑAMIENTO				PORCENTAJE DE APROVECHAMIENTO
		A	B	C	D	
1978	67335	471345	84842	11746	2114	2.5
1980	77458	542206	97597	15132	2723	2.8
1981	72010	504070	90732	13099	2390	2.6
MEDIA	72268	505874	91057	13312	2396	2.6

Elaborada en base a datos de los Anuarios Estadísticos Pesqueros del Departamento de Pesca (México).

- A) Volumen potencial de captura en toneladas.
- B) Equivalente en toneladas de proteína del volumen potencial de captura.
- C) Volumen real capturado en toneladas.
- D) Equivalente en toneladas de proteína del volumen real capturado.

de leche destinados a la alimentación de ganado. Los hidrolizados de proteína de pescado reúnen estos requisitos, y además podrían ser usados en la formulación de medios de cultivo para microorganismos, como sustrato en procesos fermentativos, en medios para el cultivo de tejidos, en la estabilización de vacunas, en productos veterinarios, como atrayentes de insectos, en cosmetología y en la elaboración de dietas especiales para pacientes con problemas de absorción intestinal o para fenilcetonúricos (Kraft inc.).

Los hidrolizados de proteína que se piensan usar en la industria de alimentos, deben ser preparados por métodos que conserven sus cualidades nutritivas, por esta razón el proceso de hidrólisis debe efectuarse en condiciones suaves. Esta condición limita el uso de los procesos de hidrólisis química, tanto en condiciones alcalinas como ácidas ya que pueden provocar la pérdida de aminoácidos esenciales, o la formación de mezclas tóxicas de aminocetidos (Masters, 1979; Friedman, 1961; Lardon, 1983), y la formación de compuestos neurotóxicos como la histaminina (Chu, 1976; Friedman, 1961; Miller, 1983).

La hidrólisis enzimática representa una alternativa para la producción de hidrolizados de proteína presente en la fauna de acompañamiento, ya que se puede realizar en condiciones suaves de pH, temperatura y presión. A este respecto existen varios reportes sobre trabajos relacionados, pero no con fauna de acompañamiento y proteasas de origen microbiano.

Por todo lo antes expuesto, el objetivo de este trabajo fue establecer las bases de un proceso de hidrólisis enzimática de la proteína de pescado, presente en la fauna de acompañamiento del camarón, haciendo uso de proteasas microbianas producidas en México.

ANTECEDENTES;

Los procesos tradicionales para solubilizar proteína de pescado involucran el colocar el pescado en contacto con altas concentraciones de sal en grandes tanques de concreto (Salsithi, 1966; Van Veen, 1965), en donde la proteólisis ocurre espontáneamente por acción de las enzimas presentes en el pescado, lográndose que aproximadamente el 50.0 % de la proteína sea convertida a su forma soluble, estos procesos tienen una duración aproximada de un año en promedio, dando como resultado un líquido café claro el cual es separado del material sólido residual.

Las desventajas de estos procesos son las siguientes:

- a) Por ser necesario un largo período de fermentación, los costos de producción son elevados.
- b) Se tienen bajos rendimientos (50.0% de hidrólisis).
- c) Una gran cantidad de proteína es desperdiciada por la baja eficiencia del proceso.
- d) La producción de los compuestos que dan el sabor y aroma no es controlada.
- e) No son utilizados pescados que son considerados de desecho.
- f) Es necesario usar altas concentraciones de sal para evitar la contaminación microbiana.

Procesos de solubilización de proteína acelerados mediante la adición de enzimas proteolíticas.

Aunque se ha intentado solubilizar la proteína de pescado por medios químicos (Tannenbaum, 1970; Mc Bride, 1961; Ryan, 1952), se ha visto que a los productos obtenidos les falta el sabor característico de los fermentados tradicionales, por lo que no son sustitutos aceptables. Igualmente se ha observado que en los procesos alcalinos se provoca una racemización de algunos de los aminoácidos, ya que existe una pérdida considerable de los que contienen azufre, especialmente cisteína y metionina. Tanto en los procesos ácidos como alcalinos la principal desventaja, es el hecho de que posteriormente es necesario neutralizar el sobrenadante obtenido, lo que provoca que los costos se eleven.

Considerando estos problemas Roel en 1969 evaluó la posibilidad de realizar la solubilización directa de un concentrado proteico de pescado con ayuda de microorganismos, sin obtener buenos resultados. En el mismo año Hale estudió el comportamiento de 20 enzimas proteolíticas comerciales en la hidrólisis de proteína de pescado, encontrando que la más activa fue la pepsina, este estudio se realizó en condiciones de pH y temperatura cercanos al óptimo reportado por los proveedores.

En 1973 Archer observó, en un sistema de hidrólisis de proteína de pescado con una proteasa de *Bacillus subtilis* (Monzyme), que el aumento de la cuenta microbiana podía controlarse modificando el pH, encontrando que en condiciones de alcalinidad, pH 8.8, el crecimiento microbiano se detuvo totalmente. En el mismo estudio se mostró que en condiciones de pH neutro, y a 50°C, logra el 70.0 % de solubilización de la proteína total en una hora.

Ante el hecho de que en varios sistemas que involucran la interacción de una enzima soluble y un sustrato insoluble, la velocidad de reacción es proporcional a la cantidad de enzima adsorbida (Mc Laren, 1963), Archer evaluó si esto se presentaba en el sistema con músculo de pescado. Encontrando que la enzima interacciona con el sustrato adsorbiéndose rápidamente en la s partículas sólidas, dando como resultado la solubilización de la proteína y posteriormente la proteólisis de los fragmentos de proteína en solución. Este mismo fenómeno fue corroborado por Langmyr en 1961, usando enzimas marcadas y evaluando la cantidad de enzima adsorbida sobre el sustrato sólido, midiendo la radioactividad en el mismo una vez separado del sobrenadante.

Beddows en 1976 reporta los resultados obtenidos al usar bromelina en la hidrólisis de pulpa de pescado, Macarela, logrando un alto grado de proteólisis a 35°C con el 0.2 % de enzima, obteniendo un hidrolizado de pescado que tuvo algunas de las características de la salsa oriental logrando además incrementar la velocidad, así como la cantidad de proteólisis alcanzada, 75.0 %. Simultáneamente se estudio la producción de agentes que ayudan a lograr un buen aroma, llegando a la conclusión de que es imposible obtener un hidrolizado con las mismas características organolépticas que las logradas en los procesos tradicionales mediante una hidrólisis acelerada en ausencia de sal, por lo que fue necesario adicionar un 20.0 % de sal que provocó un decrecimiento en la conversión de la proteína insoluble a proteína soluble del 89.9 % al 41.8 %.

En 1976 Patricio Hevia y colaboradores compararon la actividad proteolítica de tres enzimas; Bromelina, Ficina y Pronasa, las dos primeras de origen vegetal, y la última de origen microbiano. Encontrando que la pronasa a 50°C tuvo el doble de actividad que la Ficina a 40°C o que la Bromelina a 50°C; sin embargo la Ficina previamente activada por caseína y usada a 40°C fue tan activa como la Pronasa a 50°C. El máximo de solubilidad alcanzado en 7 horas fue cercano al 70.0 % del cual cerca del 80.0 % ocurrió en las dos primeras horas, logrando una fracción soluble de sabor amargo.

El efecto de adicionar Bromelina, Papaina o Ficina sobre la velocidad de hidrólisis y extensión de la conversión de la proteína de pescado insoluble a nitrogeno soluble en condiciones similares a las usadas en los procesos tradicionales, fue examinado por Beddows en el año de 1979, encontrando que la velocidad de producción de sobrenadante y la conversión de proteínas insoluble a soluble durante el tiempo fueron mejores en los sistemas en que se usó Bromelina, logrando 0.75 cm³ de sobrenadante por gramo de sustrato en un periodo de 18 a 21 días, dando un 65.0 % de proteínas solubilizada. Con las tres enzimas se obtuvieron hidrolizados claros de color café con valores altos de proteína y suave aroma. Es necesario puntualizar que en este sistema la velocidad de conversión para

la Papaína y Ficina fueron bajas, debido a que la proteólisis se llevó a cabo en condiciones de alta salinidad, de 10.0 a 70.0 g de sal, lo cual provocó un detrimento en la actividad proteolítica de las tres enzimas.

La preparación de un hidrolizado de proteína de pescado, a partir de una mezcla de diferentes especies, usando Papaína fue reportada por Thankama en 1979 y comprueba que es posible obtener un hidrolizado con muestras que contengan varias especies de pescado.

Como se ve, la mayoría de las enzimas proteolíticas que se han probado para solubilizar este sustrato y que han tenido un éxito relativo, son de origen animal (pepsina y tripsina) o de origen vegetal (Bromelina y Papaína) Tablas IV, V, VI Y VII. Los estudios realizados con enzimas de origen microbiano han sido escasos, Tabla VIII, habiéndose usado enzimas de *Aspergillus flavus*, *Actinomicetes fradiae*, *Thermocactinomicetes vulgaris*, *Synonymicetes grisea*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus polymyxa* y *Bacillus subtilis*.

A nivel nacional las enzimas de origen animal tienen precios elevados, ya que su producción se ve reducida a niveles muy bajos, por ser un subproducto de los procesos implementados con el fin de obtener carne, además es necesario importarla, por esto su utilización se ve reducida a la industria farmacéutica que requiere volúmenes muy pequeños de enzima.

Aún en Estados Unidos el uso de este tipo de enzimas en la hidrólisis de proteínas de pescado se ha visto limitado, un ejemplo lo constituye el hecho de que a pesar de que el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, de la Universidad de Washington ha desarrollado un proceso enzimático para producir hidrolizados de proteínas de pescado, usando pepsina (Tarky, 1971; Heggeland, 1975; Escove, 1976; Pigott, 1978), esto se ha visto limitado por el alto costo de la enzima, la cual solo puede ser adquirida con grado farmacéutico, razón por la que ha sido necesario desarrollar un método para producir preparaciones de pepsina cruda (por autodigestión de mucosa intestinal de cerdos) suficientemente puras, que permitan operar en forma eficiente y económica este proceso (Lin, 1981).

Con las enzimas de origen vegetal se presenta el problema de que las plantas de las que se obtienen, están sujetas a factores climatológicos y ciclos de producción que limitan su disponibilidad, e igualmente son importadas. Además de que son cultivos cuyos frutos se destinan para consumo humano, lo que hace más crítica la situación.

En este sentido las enzimas proteolíticas de origen microbiano poseen un gran potencial, ya que pueden generarse anualmente grandes cantidades, sin necesidad de extensas áreas de cultivo, ni de ciclos de producción o variaciones climatológicas.

Por otro lado, no se debe olvidar que uno de los principales problemas en la hidrólisis de proteínas es la formación de compuestos que generan sabores amargos, en este sentido Ney (1972) observó que el sabor amargo es debido a un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos en el hidrolizado. Además se ha visto que el tipo de enzima usada para la hidrólisis tiene un efecto en la presencia de sabores amargos, por ejemplo en sistemas en

TABLA IV

USO DE PROTEASAS DE ORIGEN VEGETAL EN LA PRODUCCION DE HIDROLIZADOS PROTEICOS A PARTIR DE CONCENTRADOS PROTEICOS DE PESCADO (C/P).

SUBSTRATO		ENZIMA	PROVEDOR	REFERENCIA
NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO			
Pato de bombay	<i>Harpodon nemorosus</i>	Papaína	2	Warrier, 1981
Gulf menhaden		Bromelina	13	Hoviv, 1976
		Ficina	13	
		Bromelina	3	
Bacalao	<i>Gadus morhua</i>	Ficina	5, 7, 10	Halo, 1989
		Bromelina	7, 10	
		Papaína	7, 10, 14	

2) BDH Ltd., Poole, Dorset, U.K.

3) CALBIOCHEM

5) Enzyme Development Corporation

7) Miles Lab.

10) Nutritional Biochemical Corporation

13) Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri

14) Wallerstein, Co.

TABLA V

USO DE PROTEASAS DE ORIGEN VEGETAL EN LA PRODUCCION DE HIDROLIZADOS PROTEICOS A PARTIR DE MUSCULO O DESECHOS DE FISCADO.

SUSTRATO		ENZIMA	PROVEDOR	REFERENCIA
NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO			
Bacalao	Gadus morhua	Papaína		Mackie, 1962
Pescadilla ami	Micromesistius poutassou	Papaína		
Bacalao	Gadus morhua	Papaína	11	Ritche, 1962
Itambilla	Stenoporus sp	Bromelina	2	Beddows, 1979
		Papaína	13	
		Pielina	13	
F.A.C.	---	Papaína		Thakana, 1979
Por ingarto	Saurida tumbil	Papaína		
Por espada	Platyccephalus macrocephalus	Papaína		
Por listón	Tilichthys sp	Papaína		
Barracuda	Sphyrna sp	Papaína		
Por jodio	Johnia sp	Papaína		
Alm de hilo	Nemipterus japonicus	Papaína		
Bago	Tachurus sp	Papaína		
Anchoveta	Tilacodus sp	Papaína		
Langosta	Cynoglossus sp.	Papaína		
Tilapia	Tilapia hybrida	Bromelina		Nunes, 1982
Sacrei	Trachurus trachurus	Papaína		Pastorina, 1977

2) BDH Ltd., Poole, Dorset, U.K.
 11) Powell and Schofield, Liverpool, England
 13) Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri

TABLA VI

USO DE ENZIMAS DE ORIGEN ANIMAL EN LA PRODUCCION DE HIDROLIZADOS PROTEICOS A PARTIR DE CONCENTRADOS DE PROTEINA DE PESCADO (CFF)

SUTRATO		ENZIMA	PROVEEDOR	REFERENCIA
NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO			
LangÓsido	<i>Achirus lineatus</i>	Pepsina	13	Montecarlo, 1984
Pato de Bombay	<i>Harporodon neherus</i>	Pepsina	6	Warrier, 1981
Morizan del Pacifico	<i>Morfacinus productus</i>	Pancreatina grado "E"	3	Archer, 1973
Bacalao	<i>Gadus morhua</i>	Pepsina	4,10, 15	Hale, 1969
		Pancreatina	4	
		Tripsina	15	
Morizan rojo	<i>Urophycis chuss</i>	Pancreatina -		Hale, 1972

3) CALBIOCHEM

4) Cadaby, Lab.

6) E. Merck, Germany

10) Nutritional Biochemical Corporation

13) Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri

15) Wilson, Lab.

TABLA VII

USO DE PROTEASAS DE ORIGEN ANIMAL EN LA PRODUCCION DE HIDROLIZADOS PROTEICOS A PARTIR DE MUSCULO O DEBECOS DE PESCADO.

SUSTRATO		ENZIMA	PROVEEDOR	REFERENCIA
NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO			
-----	Sebastes sp.	Pepsina cruda	1,13, 16	Lin Lin, 1981
Sardina	Sardinops melanosticta	Pepsina	-	Ooshiro, 1981
Medusa	Moriscoccus gryl	Pepsina	2	Tarki, 1977
Langosta ingles	Parophrys vetulus	Pepsina	2	Tarki, 1973
Visceras de pescado	-----	Pepsina	-	Helov, 1976

1) American Lab.

2) BDH Lab., Poole, Dorset, U.K.

13) Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri

16) Worthington, Biochemical Co.

TABLA VIII

USO DE PROTEASAS DE ORIGEN MICROBIANO EN LA PRODUCCION DE HIDROLIZADOS PROTEICOS A PARTIR DE CONCENTRADOS DE PROTEINA DE PESCADO.

SUSTRATO		ENZIMA		
NOMBRE COMUN	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE COMERCIAL	FUENTE	REFERENCIA
Pato de bombay	Harpodon neborous	Pronasa	Streptomicos 2 griseus	Warrier, 1961
Bacalao	Gadus morhua	Alcalasa	Bacillus 9 licheniformis	Laksidis, 1978
Gall menadon		Pronasa grado "B"	Streptomicos 3 griseus	Hevia, 1976
Morizan roja	Urophycis chuss	Mouzyme	Bacillus 8 subtilis	Archer, 1973a
Morizan del Pacifico	Moriscicus productus	Pronasa grado "B" Mouzyme PA-I	Streptomicos 3 griseus Bacillus 8 subtilis	Archer, 1973b
Pez espada	Xiphias gladius	Mouzyme PA-I	Bacillus 8 subtilis	
Bacalao	Gadus morhua	Proteasa bacteriana HT proteolitic Proteasa fungal Rhozyme P-II Rhozyme PF Pronasa Pronasa	Bacillus 7 subtilis 7 Aspergillus 12 flavus Bacillus 12 subtilis Streptomicos 3 griseus Streptomicos 3 griseus	9 Hale, 1969
Morizan roja	Urophycis chuss	Proteasa alcalina Neutman	Bacillus 12 subtilis	- Fajlanaki, 1973 - Hale, 1972 - Ehemthamren, 1983

2) BDH Ltd., Poole, Dorset, U.K.

3) CALBIOCHEM

7) Miles, Lab.

8) Monsanto Co. St. Louis Missouri

9) Novo Industri A/S Denmark

12) Rohm and Haas

que se usan Papaína o Ficina se producen más péptidos generadores de sabores amargos, que en los que se usa Pronasa (Fujimaki, 1975). Aparentemente este problema se presenta también en la hidrólisis de proteínas de pescado cuando se usan enzimas de origen vegetal (Hovia, 1976).

Así mismo en los estudios evaluados, los sustratos usados en general, son concentrados proteicos de pescado (CPP) o el músculo de pescado sin tratar (M), entendiéndose este último como filetes, desecho de filetes, vísceras o menudas de los mismos y en un solo caso se ha usado como sustrato fauna de acompañamiento y Papaína para hidrólisis (Thakura, 1979).

Por lo tanto, y considerando las características de las proteasas vegetales y animales antes mencionadas, y los estudios realizados a la fecha, se puede concluir que las proteasas microbianas pueden, y deben ser utilizadas para desarrollar procesos dirigidos a la producción de concentrados de péptidos solubles y aminoácidos, a partir de la proteína de la fauna de acompañamiento.

Por estas razones, en este trabajo se evaluó el uso de dos preparaciones comerciales de proteasas que se producen en México, para desarrollar un proceso biotecnológico de hidrólisis de proteínas de pescado, y fauna de acompañamiento capturada en las costas de Sinaloa. Ambas son preparaciones crudas, la BR es una proteasa neutra, y la DT es una proteasa alcalina de *Bacillus subtilis*.

MATERIAL Y METODOS:

1. Reactivos analíticos:

De J.T. Baker de México, S.A. de C.V.: ácido sulfúrico, ácido bórico, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido tricloroacético, carbonato de sodio, citrato de sodio, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico, hidróxido de sodio y cloruro de sodio.

De Sigma de México, S.A.: caseína y reactivo de fenol-folin cloacaltes.

De Sigma Chemical Co. U.S.A.: albumina sérica bovina. De Merck de México, S.A.: tartrato doble de sodio y potasio. De Bionon de México, S.A.: agar para cuenta estándar

De F. Merck, Darmstadt, Rep. Fed. de Alemania.: L-triptófano, L-tirosina, mezcla reactiva de selenio y glutatión. De Pharmacia Fine Chemicals: sephadex G-15

2. Reactivos industriales.

De Droguería Cosmopolita, S.A. México, D.F.: fosfato de potasio dibásico e hidróxido de sodio

3. Sustratos:

Se utilizaron: harina de pescado obtenida en el puerto de Mazatlán, Sinaloa. Músculo de mojarra y mojarra entera (*Bacostomus argenteus*), adquiridos en supermercados de la ciudad de México. Fauna de acompañamiento del camarón, capturado en cruceros del buque oceanográfico "El Puma" en las costas de Mazatlán, Sinaloa.

Cuando se usó músculo de mojarra, mojarra entera o fauna de acompañamiento las muestras fueron molidas una sola vez en un molino manual "Alexander Werk", con una criba con perforaciones de 5.0 mm.

En el caso de la harina de pescado no se efectuó ningún proceso de preparación, se utilizó como le surge al proveedor.

4. Preparaciones proteolíticas de uso industrial:

Para el desarrollo de este trabajo se usaron las preparaciones BR y DT, mismas que fueron donadas por la compañía ENMEX, S.A. La preparación BR es una mezcla de una proteasa neutra y α -amilasa de *Bacillus subtilis*, que tiene aplicaciones en la industria cervecera. En tanto que la preparación DT es una mezcla de una proteasa alcalina y α -amilasa de *Bacillus subtilis*, que se usa en la formulación de detergentes. La actividad de cada preparación fué de 147 000 y 133 300 unidades por kilogramo respectivamente. La unidad

de actividad proteolítica de estas preparaciones se definió como la cantidad de de preparación enzimática necesaria para liberar una micromol de Tirosina por minuto, usando como sustrato caseína al 2.0% en amortiguador de fosfatos 0.2M de pH 7.0 y 37°C de temperatura. Es importante señalar que la preparación DT tiene un costo relativo tres veces menor que la preparación BR.

5. Método para determinar la actividad proteolítica sobre caseína.

Se siguió el método reportado por Kunitz en 1977, que consiste en cuantificar la tirosina liberada, en un sistema de reacción que contiene 2.0 ml de una solución de caseína al 2.0% en amortiguador de fosfatos 0.2 M de pH 7.0, mas 1.0 ml de una solución de enzima al 1.0 % en el mismo amortiguador. Estos sistemas fueron incubados a 37°C durante 30 minutos; la reacción fue detenida adicionando 4.0 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5.0 %, la cantidad de tirosina liberada fue cuantificada por el método de Lowry (1951), interpolando los valores de absorbancia leída a 590 nm en una curva estandar de tirosina.

6. Actividad proteolítica cuantificada como proteína hidrolizada soluble en TCA.

Esta determinación se realizó cuando se evaluó la actividad proteolítica, de cualquiera de las enzimas probadas sobre harina de pescado, músculo de pescado, pescado entero o fauna de acompañamiento.

a) Sistema de hidrólisis en matriz.

Matraces Erlenmeyer de 125 ml con 10.0 g del sustrato indicado en cada experimento y 40.0 ml de buffer, fueron preincubados durante quince minutos a la temperatura de ensayo y posteriormente se le adicionaron 10.0 ml de una solución de enzima preparada en el mismo amortiguador a la concentración indicada en cada caso, y fueron incubados en un agitador rotatorio Psychrotorm de New Brunswick Scientific Co. a 200 rpm, excepto en los casos en que se vario la velocidad de agitación. Durante el proceso de hidrólisis se tomaron muestras, sacrificando matriz por tiempo, la reacción se detuvo mediante la edición de 10.0 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5.0 %, todas las muestras se mantuvieron a 4°C durante 24 horas, posteriormente fueron centrifugadas a 10 000 rpm durante quince minutos y se determinó la proteína hidrolizada soluble en TCA, presente en el sobrenadante, por el método de Lowry (1953), interpolando los valores de absorbancia leída a 590 nm en una curva estandar de albumina sérica bovina.

b) Sistema de hidrólisis en sustratos de 5 y 14 Nitros.

Para llevar a cabo la hidrólisis de la fracción proteína del músculo de pescado, pescado entero y fauna de acompañamiento en reactores de 5 y 14, Nitros tambien se utilizó amortiguador de fosfatos 0.2 M de pH 7.0 pero con una concentración de sustrato del 33.0 % en peso húmedo, mandando como volúmenes de trabajo 5 y 10 Nitros respectivamente.

Los sistemas fueron preincubados hasta llevarlos a la temperatura de 50°C, posteriormente se adicionó 5.0 gramos de la preparación BR para obtener una relación enzima-sustrato (E/S) de 0.005 igual a la obtenida como la mejor en el sistema de matriz.

A los tiempos señalados en cada experimento se tomaron muestras de aproximadamente 100.0 ml, y se les midió el pH. Después se tomaron alícuotas de 30.0 ml a las que se les adicionó 5.0 ml de TCA al 5.0 % y se mantuvieron 24 horas a 4°C. Posteriormente fueron centrifugadas a 10 000 rpm durante 15 minutos. Finalmente se cuantificó el nitrógeno soluble en TCA presente en el sobrenadante, siguiendo el método de Lowry.

A otra alícuota, de 30.0 ml se le adicionaron 5.0 ml de agua destilada y fue centrifugada a 10 000 rpm durante 15 minutos, los sólidos obtenidos se secaron a 70°C en estufa de vacío, en el sobrenadante se cuantificó el nitrógeno soluble total siguiendo el mismo método.

7. Índice de contaminación.

Para determinar el índice de contaminación de los hidrolizados, se hicieron diluciones desde 1:10 hasta 1:1000. Alícuotas de 0.1 ml se sembraron en placas de agar para cuenta estándar, y se incubaron a 37 y 50°C durante 24 horas, para efectuar la cuenta de microorganismos totales.

8. Balance de materiales.

Cuando se realizó el balance de materiales, el sistema se incubó tres horas y posteriormente fue filtrado a través de un tamiz de 20 mallas, el material que se retuvo en ella fue secado a 70°C en estufa de vacío, el filtrado fue centrifugado a 10 000 rpm durante 15 minutos, y los sólidos obtenidos en el paquete fueron secados también a 70°C. Finalmente el sobrenadante fue secado por liofilización.

9. Análisis bromatológico.

En este paquete se incluyen las siguientes determinaciones: humedad, cenizas, proteínas y extracto etéreo, que se efectuaron de acuerdo con el A.O.A.C. (1970).

a) Determinación de humedad.

Fueron pesados de 2.0 a 3.0 gramos de las muestras y colocados en un pesafiltro previamente llevado a peso constante. Se secaron en estufa con vacío a 70°C hasta llegar a peso constante.

b) Determinación de cenizas:

Se carbonizaron las muestras con mechero, y se calcinaron en una mufla cuidando que la temperatura no pasara de los 550°C, para evitar que los cloruros se volatilizaran. Se termino este proceso cuando las cenizas estuvieron blancas o grises. Cuando se observaron puntos negros en las muestras, estas se humedecieron con unas gotas de agua destilada, se secaron y se calcinaron nuevamente. Despues se enfriaron en un desecador, se pesaron y se calculó el porcentaje de cenizas.

c) Determinación de proteínas crudas:

Se determinaron por el metodo de Kjeldahl, en este método las proteínas y otras materias orgánicas son oxidadas por acción del ácido sulfúrico, y el nitrógeno orgánico se fija como sulfato de amonio. Al hacer reaccionar esta sal con una base fuerte, se desprende amoníaco que se destila por arrastre de vapor, y se recibe en un volumen conocido de ácido valorado. Por titulación del ácido neutralizado, se calcula la cantidad de amoníaco desprendido, y así la cantidad de nitrógeno, valor que multiplicado por el factor de 6.25 da el porcentaje de proteína cruda.

A un gramo de muestra se agregan 3.0 gramos de mezcla salina y 25.0 ml de ácido sulfúrico concentrado, en un matraz Kjeldahl de 500.0 ml, que se calienta hasta la total digestión de la materia orgánica; es decir hasta que la solución queda completamente cristalina, se enfría y se diluye con 400.0 ml de agua destilada. Se le añaden cinco gotas de fenolftaleína y 50.0 ml de una solución de hidróxido de sodio al 50.0 %, haciendola resubir lentamente por las paredes del matraz de tal manera que se estratifican las dos soluciones, y se conecta el matraz rapidamente al sistema de destilación. Una vez conectado se mezclan las dos soluciones, se calienta, y el destilado se recibe en un matraz Erlenmeyer de 500.0 ml contenido 50.0 ml de la solución de ácido bórico al 4.0 %, y verde de bromocresol como indicador. Cuando el volumen del destilado es de 200.0 ml, se suspende la destilación y se titula con ácido clorhídrico 0.1 N hasta alcanzar nuevamente el color verde característico del verde de bromocresol en solución neutra.

El porcentaje de proteínas se calcula con la siguiente fórmula;

$$\% \text{ de proteína cruda} = \frac{(\text{ml. HCl gastado}) (\text{ml. del HCl} \times \text{N}) (\text{ml. de } 6.25)}{\text{Peso de muestra}}$$

d) Determinación de grasas crudas:

Se pesaron de 2.0 a 3.0 gramos de muestra y se colocaron en un cartucho de extracción, puesto previamente a peso constante, se pesó este paquete y se colocó en el extractor de Soxhlet cerrando cuidadosamente los extremos del cartucho. El extractor se armó sin poner grasa en las juntas, se agregó éter sulfúrico por el refrigerante en una cantidad igual a tres veces el volumen del reservorio del cartucho y se calentó el matraz con pantalla cerrada, para saber cuando se termina la extracción, se hizo una prueba dejando caer las últimas gotas de la descarga sobre un vidrio de reloj; al evaporarse el éter no debe dejar residuos de

grasa. El cartucho se deja en la campana hasta la total evaporación del éter, y se lleva a 70°C en una estufa con vacío hasta tener peso constante.

10. Cromatografía de los hidrolizados en columna de saphader G15.

Se utilizó una columna LKB de 57.0 cms de longitud y un diámetro interno de 2.6 cm, empacada con 302.0 ml de saphader G-15 previamente equilibrada con amortiguador de fosfatos 0.02 M, pH 7.0. Se aplicó una alícuota de 10.0 ml de muestra previamente neutralizada con NaOH 1.0 N. La velocidad de flujo que se usó para la elución fue de 100.0 ml/h, colectándose fracciones de 10.0 ml cada una, a las que se les midió la densidad óptica a 280 nm.

Las moléculas de bajo peso molecular que se usaron como referencia fueron: Glutatión (P.M. 307.3), Tirosina (P.M. 181.2) y Triptófano (P.M. 204.2). El volumen de elución en que salieron de la columna se muestra en la figura 2.

11. Determinación del perfil de aminoácidos.

Se usaron muestras de hidrolizados de tres horas, obtenidos de un cálculo de pescado (*Brecoctonus argenteus*). Para ello se recuperó la fracción hidrolizada, filtrando toda la muestra a través de un tamiz de 20 mallas.

El filtrado obtenido fue centrifugado a 10 000 rpm durante 15 minutos, para eliminar los sólidos finos, finalmente el material soluble presente en el sobrenadante fue recuperado por liofilización. Posteriormente 1.0 g de los liofilizados fueron sometidos a digestión con 10.0 ml de HCl 1.0 N, en ampollitas selladas al vacío e incubadas durante 24 horas a 110°C, y finalmente fueron analizadas en un analizador Beckman.

12. Determinación de triptófano.

La cuantificación del triptófano presente en los hidrolizados obtenidos después de tres horas de proceso, se realizó sometiendo un gramo de muestra a una digestión química en condiciones alcalinas, añadiendo 10.0 ml de NaOH 1.0 N en ampollitas selladas al vacío e incubadas a 110°C durante 24 horas. Las muestras así tratadas fueron analizadas según la técnica reportada por Dalby (1974).

La reacción se lleva a cabo añadiendo a 0.5 ml de la muestra, 2.0 ml del reactivo "C" (1A+1B). El reactivo "A" es una solución de anhídrido acético al 2.0% en ácido acético glacial, más 270.0 mg de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ disueltos en 0.5 ml de agua por cada litro de solución, el reactivo "B" es ácido sulfúrico 30.0 N.

La mezcla es agitada vigorosamente de inmediato, y posteriormente incubada a 60°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo la muestra es enfriada en hielo, y la

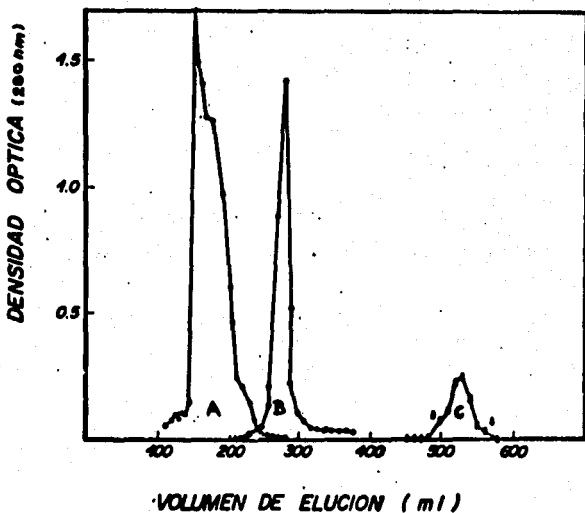


Figura 2.- Perfil de elucion de moléculas de bajo peso molecular usadas como referencia para conocer el tamaño de los productos obtenidos en la hidrólisis de proteínas de pescado. En una columna de 2.6 por 57.0 cms, empacada con sephadex G-15, y eluida con buffer de fosfatos 0.02M de pH 7.2 y velocidad de flujo de 100 ml/h.

- A) Citronina P.M. 307.3
- B) Tirosina P.M. 181.2
- C) Triptofano P.M. 204.2

absorbancia se lee a 575 nm. Las lecturas obtenidas son interpoladas en una curva estandar de triptofano.

13. Solubilidad de los hidrolizados de músculo de pescado.

Para evaluar la solubilidad de los hidrolizados se mezclaron cantidades crecientes del mismo en tubos diferentes, conteniendo cada uno 5.0 ml de amortiguador de citratos 0.2M de pH 5 y 6, o amortiguador de fosfatos 0.2M de pH 6, 7 y 8. Las soluciones fueron centrifugadas a 10 000 rpm por 15 minutos para eliminar los sólidos en suspensión. Después se midió la proteína soluble en el sobrenadante por el método de Lowry y se calculó el porcentaje de solubilidad tomando como 100.0 % la cantidad total de hidrolizado adicionada a los 5.0 ml de buffer.

RESULTADOS Y DISCUSION

De acuerdo con nuestro objetivo, inicialmente se realizó un análisis de las características de las enzimas industriales que se producen en nuestro País, así como de sus propiedades, usos, disponibilidad y costo, para seleccionar aquellas más viables de ser usadas en el desarrollo de un proceso enzimático, para la producción de hidrolizados de proteína de pescado.

En México son pocas las empresas que producen preparaciones enzimáticas crudas para uso industrial, y en relación a las enzimas microbianas solo dos cuentan con plantas dedicadas a la producción de proteasas industriales por fermentación sumergida. La primera empresa las produce mediante una fermentación controlada, y a partir de una cepa mejorada de *Bacillus subtilis*, obteniendo la preparación "BR" que es una mezcla de enzimas que tiene principalmente actividad proteolítica neutra, y de α -amilasa. También produce la preparación "DT", que es una preparación cruda de una proteasa alcalina de *Bacillus subtilis*, destinada al uso en la industria de los detergentes biológicos. La segunda empresa produce también una preparación cruda con actividad proteolítica alcalina, que obtiene de una cepa mejorada de *Bacillus subtilis*, y destinada también al uso en la formulación de detergentes. Esta empresa en el momento en que se inició este trabajo, tenía toda su producción comprometida, y se veía en la necesidad de realizar importaciones para cubrir la demanda existente.

Por otro lado, la primera tenía planeado el crecimiento de su planta de fermentación, para poder aumentar la oferta de sus productos. A la fecha estos planes pasaron a ser una realidad. Es decir, fue la única compañía capaz de ofrecer preparaciones enzimáticas crudas, de origen microbiano, producidas en México, durante todo el año, de bajo costo, con alta disponibilidad, y de uso en las industrias de alimentos y detergentes, las cuales requieren de condiciones sanitarias estrictas en cuanto a las características exigidas a este tipo de materias primas.

Por estas razones se seleccionaron las preparaciones "BR" y "DT" para realizar este trabajo. Una vez adquiridas estas enzimas, se procedió a determinar la actividad, para corroborar la que reportaba el proveedor. La actividad proteolítica obtenida en estas preparaciones fue de 147.0 y 133.0 U/mg de preparación cruda, respectivamente.

En relación al sustrato, como ya se mencionó, el objetivo del trabajo está orientado a la utilización de la fauna de acompañamiento como materia prima, para obtener los hidrolizados proteicos. Sin embargo, cabe señalar que dada la lejanía de los sitios en que se captura la fauna de acompañamiento, resultó difícil tener un aprovisionamiento adecuado y continuo de este material durante todo el tiempo de realización de estos estudios. Por otro lado, tener un lote suficientemente grande de fauna de acompañamiento para efectuar todos los experimentos, resultaba además de costoso, riesgoso dado que es un material que aún en congelación sufre modificaciones bioquímicas.

Por estas razones se decidió iniciar los estudios con la especie pesquera que fuera más abundante en la fauna de acompañamiento, y que además, estuviera disponible durante todo el año en el comercio de la ciudad de México.

Cabe mencionar en este sentido, que Chávez en 1972 reportó que el pescado más abundante en la fauna de acompañamiento capturada en el Golfo de California, es la mojarra (*Bacinosotomas argenteus*), y que representa el 32.6 % del total de las especies pesqueras capturadas, las que en conjunto representan el 80.0 % del total de la fauna de acompañamiento. Este dato fue corroborado mediante la cuantificación, en un lote de fauna de acompañamiento capturada en las costas del estado de Sinaloa. De las especies pesqueras presentes, se encontró que las más abundantes fueron la mojarra (*Bacinosotomas argenteus*) y el bagre (*Rhagnum*.) que representaron el 42.9 % y 19.8 % del peso total de la muestra.

Por este motivo fue seleccionada la mojarra como sustrato y por facilidad de operación se utilizó inicialmente el músculo de mojarra como sustrato.

La figura 3 muestra el perfil de hidrólisis del músculo de mojarra (*Bacinosotomas argenteus*), la acumulación de productos solubles en TCA por acción de las preparaciones "BR" y "DT" en una relación E/S de 0.01 fijada arbitrariamente. En este gráfico puede observarse que aunque las dos preparaciones son capaces de hidrolizar la proteína del músculo de pescado en las condiciones usadas para el ensayo, la preparación BR mostró una mayor actividad proteolítica, ya que con ella se logró acumular 12.6 g de proteína hidrolizada soluble en TCA en tres horas, en tanto que con la preparación "DT" solo se logró acumular 4.4 g del mismo material, así mismo la acumulación de proteínas hidrolizadas solubles en TCA por acción de las proteasas presentes en el músculo o por fenómenos de solubilización, fue tan solo de 1.9 g.

Estos datos muestran claramente la eficiencia de las proteasas microbianas para convertir al músculo de pescado en productos de degradación de tamaño relativamente pequeño y que por lo tanto son solubles en TCA.

Como ya se menciona el ensayo se realizó en condiciones de temperatura media y a un pH cercano al neutro, y no en condiciones óptimas para la enzima que se está usando, por lo que con este experimento no se puede todavía descartar a alguna de las dos.

Por esta razón se evaluó el efecto de temperatura y pH sobre ambas preparaciones enzimáticas para poder seleccionar a la mejor.

PROTEINA HIDROLIZADA Y SOLUBLE EN TCA (G/L)

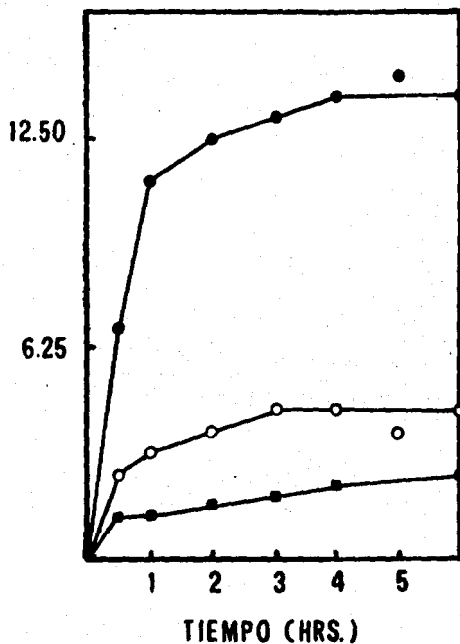


Figura 3.- Hidrólisis de músculo de mojarra (*Basilichthys argenteus*) con las preparaciones "DT" (o); "BR" (□) y sin la adición de enzima (●) en un sistema con 166.7 g/l de peso húmedo de músculo y 1.67 g/l de la preparación cruda de enzima para obtener una relación E/S = 0.01, en buffer de fosfatos 0.2 M de pH 7.0, a una temperatura de 40°C y 200 rpm.

EFFECTO DE LOS PARAMETROS FISICOQUIMICOS SOBRE LA HIDROLISIS ENZIMATICA DE PROTEINA DE MUSCULO DE PESCADO.

a) Efecto de la temperatura sobre la velocidad de hidrólisis.

Tomando en consideración los datos de la hidrólisis con ambas preparaciones enzimáticas a 40°C, se probaron diferentes temperaturas para determinar la óptima para realizar la hidrólisis de la proteína del músculo de pescado. En la figura 4 se puede observar que la preparación "BR" presenta la mayor actividad en un rango que va de 40.0°C a 50.0°C siendo acumulados aproximadamente 14.3 g de proteínas hidrolizadas soluble en TCA en tres horas, en tanto que a 30°C y 60°C la actividad fue menor.

La preparación "DT" en ninguna de las temperaturas probadas mostro mayor actividad que la "BR", y la máxima actividad presente en la preparación "DT" fue aproximadamente del 50.0% de la "BR", disminuyendo conforme aumenta la temperatura de 30°C a 60°C.

Los resultados obtenidos con la preparación "BR" concuerdan con la información técnica dada por el proveedor en la que se menciona que la temperatura óptima para esta preparación es de 50°C mientras que para la preparación "DT" reporta un máximo de actividad también a 50°C. En nuestro sistema no se observa el comportamiento esperado sino que expresa la máxima actividad en un intervalo que va de 30°C a 40°C disminuyendo su eficiencia conforme aumenta la temperatura.

Por otro lado, en todos los reportes en los que se realiza la hidrólisis de la proteína de pescado con enzimas de *Bacillus subtilis*, la temperatura que se maneja es de 50°C (Archer, 1973a; Archer, 1973b; Hale, 1968; Hale, 1972; Bumibhamon, 1983).

b) Efecto del pH sobre la velocidad de hidrólisis.

Para determinar el pH más adecuado para ambas preparaciones, se fijó la temperatura a 50°C para la preparación BR y 30°C para la "DT", valores obtenidos en la etapa anterior, y se usaron amortiguador de citratos y de fosfatos, ambos 0.2M, el primero para el rango de pH de 3.0 a 6.0 y el segundo de 6.0 a 8.0.

La máxima actividad para "BR" fue obtenida a pH 8.0; aunque "DT" en el intervalo estudiado mostró dos picos de actividad uno a pH 5.0 y el otro a pH 7.0, el nivel de proteína hidrolizada soluble en TCA logrado con esta preparación nunca fue mayor que el obtenido con la preparación "BR" (figura 5). Este comportamiento puede ser debido a la presencia de dos proteasas en la preparación cruda, con diferentes valores de pH óptimo.

Los resultados obtenidos para la preparación "BR" en el intervalo estudiado concuerdan con los obtenidos por autores que han usado proteasas de *Bacillus subtilis* (Archer, 1973a; Archer, 1973b; Hale, 1968; Hale, 1972; Bumibhamon, 1981) en los que se manejan valores de pH alrededor de 7.0 y 8.8. Sin embargo es importante señalar que de los reportes

PROTEINA HIDROLIZADA Y SOLUBLE EN TCA (G/L)

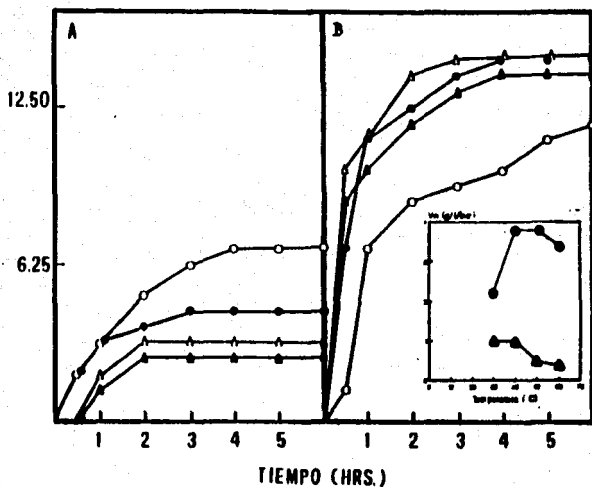


Figura 4.- Efecto de la temperatura en la hidrólisis de músculo de pezado fresco (*Echinostomus argenteus*) con las preparaciones "DT" (A) y "BR" (B) en baño de maría 0.2 M de pH 7.0 y 200 rpm de agitación a 30°C (○); 40°C (⊙); 50°C (△) y 60°C (▲) con una concentración de sustrato de 166.7 g/l de músculo de y 1.67 g/L de la preparación enzimática, Relación E/S=0.01; Recuerdo, "BR" (⊙) y "DT" (○).

PROTEINA HIDROLIZADA Y SOLUBLE EN TCA (G/L)

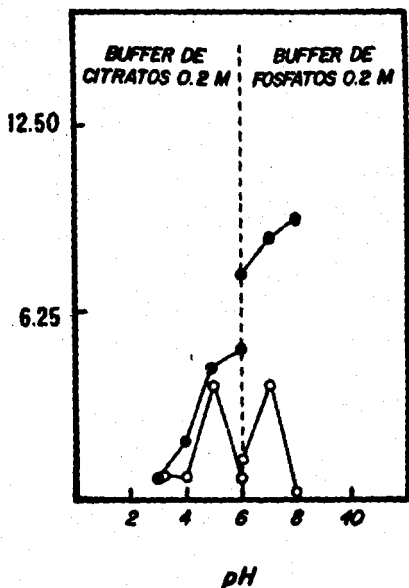


Figura 5.- Efecto del pH sobre la hidrólisis de extracto de pescado fresco (*Sardinops sagax*) con las preparaciones DT a 35°C (○) y BR a 50°C (●) a 200 rpm de agitación con una relación E/S=0.01, Concentración de sustrato= 167.0 g/l, concentración de enzima 1.67 g/l, relación E/E=0.01.

antes mencionados solo uno logra un rendimiento del 70.0 % en una hora (Archer, 1973a) los demas hablan de periodos de incubación de entre 4 y 24 horas.

Con la información generada hasta el momento no se observaron cambios sustanciales en el comportamiento de la preparación "DT", es decir, en ninguna condición aumentó considerablemente la actividad en relación con la preparación "BR". Por este motivo se siguieron los estudios sólo con esta última preparación. Y también se escogió una temperatura de 30°C y el amortiguador de fosfatos 0.2 M de pH 7.0 como el sistema para realizar las evaluaciones posteriores, el pH se fijó a un valor de 7.0 para proteger al sistema de posible cambios bruscos de pH.

c) Efecto de la molaridad de la solución amortiguadora usada en el sistema de hidrólisis.

Evaluar el efecto de la molaridad del sistema resulta importante, ya que cuando se hace uso de un amortiguador muy concentrado el producto se obtiene con una alta concentración de sales aportadas por el mismo, y esto provoca que el porcentaje de proteína se vea disminuído, razón por la que se busca usar un amortiguador que sirva para mantener el pH, pero de baja concentración molar, con este propósito se evaluó el efecto de la molaridad del amortiguador sobre la actividad de la preparación "BR". En la figura 6 se presentan los resultados obtenidos cuando se evaluaron cinco molaridades del amortiguador de fosfatos de pH 7.0 en el intervalo de 0.1 a 0.3 M. Como puede observarse en el intervalo de 0.1 a 0.2 M la velocidad inicial de reacción se conserva practicamente constante, y sólo en el caso que se usó una molaridad de 0.25 se tuvo un incremento sustancial en este valor. Cuando se analiza el efecto de la molaridad, en términos de fuerza iónica del sistema sobre la acumulación de proteína hidrolizada soluble en TCA, se puede observar que en fuerzas iónicas por debajo de 0.4 se obtiene un ligero incremento en el nivel acumulado de proteína hidrolizada soluble en TCA.

Sin embargo, aunque el nivel máximo de proteína soluble en TCA en los amortiguadores con molaridad 0.10, 0.15 y 0.20 fue similar, cuando se usó una molaridad de 0.25 o 0.30 el valor máximo, fue decreciendo de manera sustancial, esto sugiere que la fuerza iónica del sistema no permite la adsorción de la enzima a la matriz proteica del músculo de pescado con molaridades por arriba de 0.2 M.

A este respecto, se ha reportado que en sistemas en los que se involucra la interacción de una enzima soluble y un sustrato insoluble, la velocidad de reacción es proporcional a la cantidad de enzima que se adsorbe al sustrato (Mc Laren, 1963; Archer, 1973; Dewey, 1984), y que la cantidad de enzima adsorbida puede ser modificada por la fuerza iónica del sistema (Dale, 1980). Sin embargo, en ningún trabajo de los reportados para obtener hidrolizados proteicos de pescado, se evalúa este efecto.

d) Efecto de la fuerza iónica del sistema sobre la velocidad de hidrólisis,

Con el fin de discernir si el efecto de fuerza iónica, visto en el experimento anterior, no se debía a la concentración de iones fosfato, se realizaron ensayos en los que se modificó la

PROTEINA HIDROLIZADA Y SOLUBLE EN TCA (G/L)

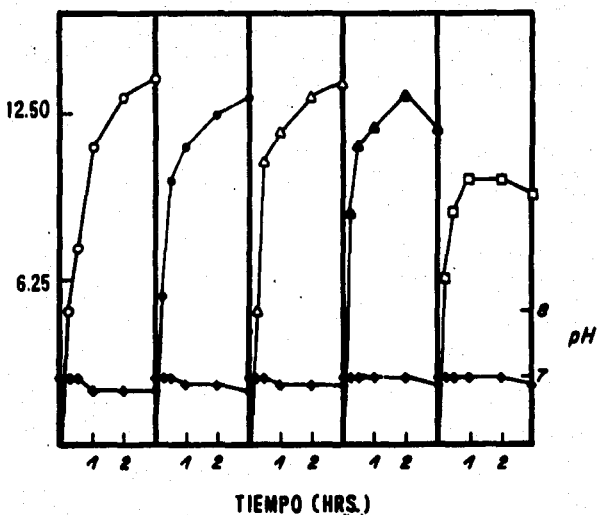


Figura 6.- Hidrólisis de proteína de médula de pescado con la preparación "BR" en buffer de fosfatos de pH 7.0, 0.10M (○); 0.15 M (⊙); 0.20 M (△); 0.25 M (▲) y 0.30 M (□) a 30°C, 200 rpm, concentración de sustrato 167.0 g/l, concentración de enzima 1.67 g/l, relación de E/S = 0.01.

fuerza iónica del amortiguador de fosfatos 0.2M de pH 7.0, mediante la adición de diferentes concentraciones de cloruro de sodio para obtener una fuerza iónica de 0.40, 0.45, 0.50, 0.55 y 0.60. Siendo el sistema con molaridad 0.40 el amortiguador de fosfatos 0.20M de pH 7.0 sin cloruro de sodio. En la figura 7 se muestran los resultados obtenidos, pudiéndose observar que en todos los casos en que se añadió cloruro de sodio, se obtuvieron velocidades iniciales por debajo de la obtenida en el control (53.0×10^{-3} g/l/min). Además de que la velocidad de reacción disminuye, el tiempo que dura con el mismo valor es más corto, siendo este efecto más acentuado en el sistema en que se usó el amortiguador de fosfatos 0.20M de pH 7.0 con fuerza iónica de 0.60, en tanto que en los sistemas con fuerza iónica de 0.45 y 0.50 se conserva un valor de velocidad de 43.0×10^{-3} g/l/min, muy cercano al de la velocidad inicial del control. En todos los casos el comportamiento del perfil de pH es el mismo.

Estos resultados muestran que existe una mínima caída de la velocidad inicial provocada por la modificación de la fuerza iónica del sistema de ensayo. Este efecto parece no repercutir en el rendimiento global del sistema, dado que los porcentajes de solubilización no presentan diferencias muy marcadas, Tabla X. Esto puede ser explicado a través de los experimentos de Langmyr reportados en 1961, en los que demuestra que al inicio de la reacción la enzima tiende a adsorberse sobre la superficie del sustrato hecho que la protegería de una posible inhibición por producto (aminoácidos libres), lo que favorecería la liberación de productos solubles, péptidos y aminoácidos libres.

Si este es el caso, conforme transcurre la reacción la concentración de sustrato sólido al cual se puede adsorber la enzima es cada vez menor, y por lo tanto la enzima queda expuesta a efectos inhibitorios provocados por los productos generados.

EFFECTO DE LOS PARAMETROS ESTEQUIOMETRICOS SOBRE LA HIDROLISIS DE PROTEINA DE MUSCULO DE PESCADO.

a) Efecto de la concentración de sustrato.

Una vez que se determinaron las mejores condiciones de operación, se evaluó el efecto de la concentración de sustrato en un sistema en el que se usó buffer de fosfatos 0.2 M de pH 7.0, una temperatura de 30°C y 200 rpm de agitación. En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos. La máxima velocidad inicial, 64×10^{-3} g/l/min, se logró cuando se usó una concentración de 231.0 g/l de músculo de pescado.

Concentraciones de sustrato por arriba de este valor, provocaron una disminución en la velocidad inicial del sistema. Como este sistema está regido por fenómenos de superficie (Langmyr, 1961) es difícil hablar de saturación de la enzima, por lo que este comportamiento puede ser atribuido al hecho de que los niveles de proteína en solución presente en los sistemas antes de adicionar la enzima se van incrementando y esto puede estar provocando la inhibición de la enzima.

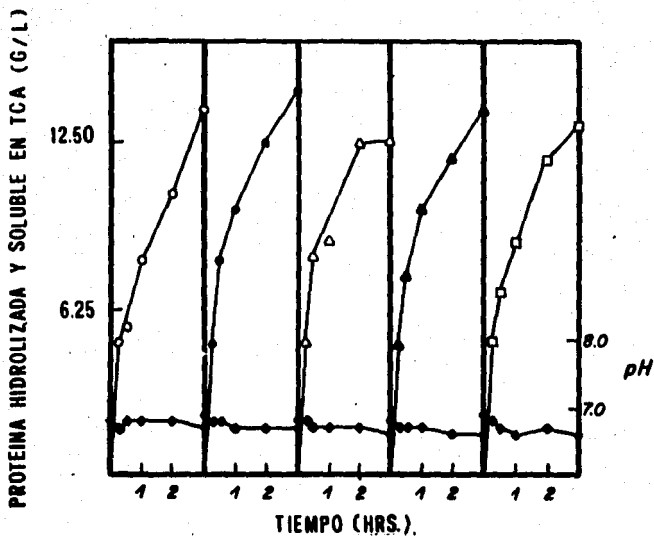


Figura 7.- Hidrólisis de proteínas del músculo de pescado (*Brevoortia argentea*) con la preparación "BR" en buffer de fosfatos 0.20 M de pH 7.0 de fuerza iónica 0.40 (○) y el mismo buffer adicionado con cantidades crecientes de cloruro de sodio hasta obtener fuerzas iónicas de 0.45 (⊙); 0.50 (△); 0.55 (▲) y 0.60 (□) a 30°C, 200 rpm, concentración de sustrato 167.0 g/l, concentración de enzima 1.67 g/l, relación E/S = 0.01.

TABLA IX

EFFECTO DE LA MODIFICACION DE LA FUERZA IONICA MEDIANTE LA ADICION DE NaCl, SOBRE LA HIDROLISIS DE PROTEINA DE MUSCULO DE PESCADOS CON LA PREPARACION "BR", A 50°C Y pH 7.0,

FUERZA¹ IONICA	SUSTRATO INICIAL TOTAL (G/L)	PROTEINA INICIAL SOLUBLE EN TCA (G/L)	PROTEINA HIDROLIZADA SOLUBLE EN TCA (G/L)	INCREMENTO PORCENTUAL
0.40	33.75	1.87	13.75	100.0
0.45	33.75	1.87	14.38	104.6
0.50	33.75	1.87	14.00	101.8
0.55	33.75	1.87	13.75	100.0
0.60	33.75	1.87	13.13	95.49

1) Obtenida al adicionar Cloruro de Sodio al buffer de fosfatos 0.2M de pH 7.0.

2) El Nitrógeno total en el sistema de reacción fue 5.4 g/l.

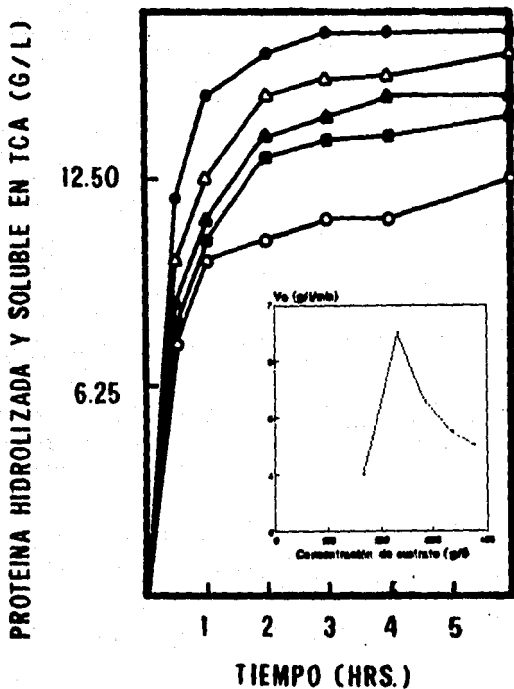


Figura 8.- Efecto de la concentración de sustrato, músculo de pececado (*Basilichthys argenteus*), sobre la actividad de la preparación "BR" 167.0 g/l (○); 231.0 g/l (◊); 286.0 g/l (△); 333.0 g/l (▲); y 375 g/l (●) en buffer de fosfatos 0.2 M de pH 7.0 a 30°C, 200 rpm, concentración de enzima 1.67 g/l.

Si se analiza el efecto de la concentración de sustrato, referido a los rendimientos de proteína hidrolizada soluble en TCA, liberada por acción enzimática, por gramo de proteína total presente en el músculo de pescado al inicio de la reacción, se observa que el máximo se obtiene en el sistema que contiene 46.16 g/l de proteína total inicial, y con concentraciones por arriba de este valor los rendimientos disminuyen, tabla X. Esto indica que estamos subutilizando el sustrato y que a cada incremento en la concentración de sustrato no corresponde un incremento proporcional en la concentración de sustrato.

Otra posible explicación podría ser que cuando la enzima está en un sistema con alta concentración de sustrato, ésta puede permanecer adsorbida al mismo durante más tiempo, y que a pesar de que puede realizar un gran número de cortes, no logre generar moléculas solubles, o lo haga en baja cantidad, por lo que los rendimientos de proteína hidrolizada soluble en TCA disminuyan al aumentar la concentración de sustrato.

b) Efecto de la concentración de enzima.

Cuando se evaluó el efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad inicial y el rendimiento del sistema, figura 9, se encontró que se puede incrementar la velocidad inicial a través de aumentar la cantidad de enzima en el sistema de reacción, sin embargo, éste incremento no es proporcional a la cantidad de enzima adicionada, tabla XI.

En los sistemas en los se usaron 1.66 y 3.33 g/l de enzima, a pesar de las diferencias en concentración, se lograron velocidades iniciales muy parecidas 28.0×10^{-3} y 30.0×10^{-3} g/l/min y los rendimientos de nitrógeno soluble en TCA por gramo de nitrógeno total, también fueron parecidos 0.43 y 0.43. Esta información deja ver que cuando se usa 3.33 g/l de enzima se está desperdiciando cuando menos el 50.0% de la enzima adicionada.

Tomando en consideración el comportamiento encontrado en el sistema en que se evaluó el efecto de la concentración de sustrato y el visto en la evaluación del efecto de la concentración de enzima se eligió como sistema para continuar con el desarrollo de este trabajo el caso en que se tiene una relación enzima/sustrato de 0.003, es decir el sistema en que se maneja 296.0 g/l de músculo de pescado y 1.67 g/l de enzima.

EFFECTO DE LOS PRETRATAMIENTOS DEL SUSTRATO SOBRE LA HIDROLISIS DE PROTEINA DE MÚSCULO DE PESCADO.

a) Efecto del pretratamiento térmico.

En algunos de los ensayos realizados, se presentó el problema de que aproximadamente a las cuatro horas de incubación se presentaba un olor fétido y coloración negra en el sistema provocados por contaminación bacteriana razón por la que se pensó en someter a la materia prima a ebullición antes del tratamiento enzimático para bajar la carga microbiana.

TABLA X

EFEECTO DE LA RELACION E/S SOBRE LA HIDROLISIS DE LA PROTEINA PRESENTE EN MUSCULO DE PESCADO CON LA PREPARACION "BR" A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO EN BUFFER DE FOSFATOS 0.2M DE pH 7.0 A 50°C Y 200 RPM.

RELACION E/S	PROTEINA INICIAL TOTAL EN TCA (G/L)	PROTEINA INICIAL SOLUBLE EN TCA (G/L)	PROTEINA HIDROLIZADA SOLUBLE (G/L)	Y G S/ G P	INCREMENTO PORCENTUAL
0.010	33.18	1.87	13.25	0.399	100.00
0.006	46.12	2.56	18.81	0.408	141.60
0.005	57.00	3.19	18.81	0.330	147.00
0.004	66.68	6.88	21.00	0.313	158.49
0.003	75.00	7.50	21.88	0.292	165.09

PROTEINA HIDROLIZADA Y SOLUBLE EN TCA (G/L)

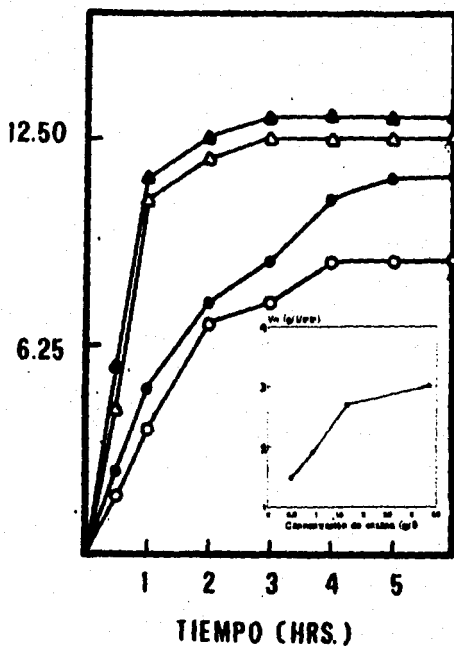


Figura 9.- Efecto de la concentración de enzima sobre la hidrólisis de proteína de músculo de pescado (*Brevoortia argentea*), 0.50 g/l (O); 0.83 g/l (●); 1.67 g/l (Δ); 3.33 g/l (▲); concentración de sustrato 167.0 g/l en buffer de fosfatos 0.2 M de pH 7.0 a 50°C y 200 rpm.

TABLA XI

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA SOBRE LA HIDROLISIS DE LA PROTEINA DE PESCADO¹ CON LA PREPARACION "BR" A LAS TRES HORAS EN BUFFER DE FOSFATOS 0.2M DE pH 7.0 A 50°C Y 200 RPM.

ENZIMA TOTAL	RELACION E/S	PROTEINA TOTAL² SOLUBLE EN TCA	INCREMENTO PORCENTUAL DE LA PROTEINA SOLUBLE EN TCA	VELOCIDAD INICIAL
(G/L)		(G/L)		(G/L/MIN)
0.30	0.003	9.38	63.21	0.010
0.63	0.005	10.63	73.91	0.013
1.66	0.010	13.96	100.00	0.028
3.33	0.020	15.00	104.34	0.050

1) El sistema tenía una concentración de proteína total igual a 33.19 g/l.

2) La proteína inicial soluble en TCA fue de 1.66 g/l.

Cuando se analizó cual era el efecto del pretratamiento térmico sobre la velocidad de hidrólisis de la proteína presente en el músculo de pescado, se sometió a los sistemas de ensayo a ebullición durante 10 y 15 minutos. En la figura 10 se presentan los resultados obtenidos, pudiéndose observar que el tratamiento por 10 minutos, no afecta la velocidad de hidrólisis y si se logra un ligero incremento, 18.75%, del nivel de proteína soluble en TCA, en el caso en que se trató a la misma temperatura, pero por un lapso de 15 minutos el efecto que se observó fue negativo, pues el nivel de proteína soluble en TCA que se logró en el control en un lapso de tres horas fue alcanzado en el sistema tratado en un lapso de 6 horas.

Esto es un resultado del cambio en la velocidad de hidrólisis que fue menor en el sistema tratado, con esta información, se decidió no llevar a cabo el tratamiento térmico, ya que no se obtendrían beneficios sustanciales y en cambio si se consumiría una cantidad considerable de energía. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Laagnyhr en 1961, en este trabajo el autor atribuye este cambio al hecho de que la proteína sarcoplasmática se coagula en la superficie de la miofibrilla generando una cubierta que dificulta el acceso de la enzima a la matriz proteica, y provoca un detrimento tanto en la velocidad de hidrólisis como en el nivel de proteínas hidrolizables solubles en TCA.

b) Efecto del secado sobre la velocidad de hidrólisis.

Dado que la fauna de acompañamiento se captura básicamente durante la temporada de pesca del camarón, y a que durante este periodo se acumula gran cantidad de este material, es necesario tener un sistema para conservarlo, por esta razón se evaluó el efecto del tipo de secado sobre la hidrólisis enzimática del músculo de pescado, esto dirigido hacia la posibilidad de implementar un método para conservar el material proteico destinado a la producción de hidrolizados proteicos.

En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos con músculo de pescado sin secar, secado a 70°C y liofilizado, en ambos tipos de secado se puede observar que este pretratamiento tiene un efecto negativo sobre la velocidad de hidrólisis y el rendimiento de proteína soluble en TCA.

En este sentido nuestro grupo también ha trabajado con harina de pescado sin obtener resultados favorables.

c) Efecto de la extracción de grasa sobre la hidrólisis de proteína presente en el músculo de pescado.

Otra posible razón por la que el material secado por cualquiera de los métodos antes mencionados no es fácilmente hidrolizable, puede ser la acumulación de la fracción grasa sobre la matriz proteica, misma que también impediría el acceso de las enzimas proteolíticas.

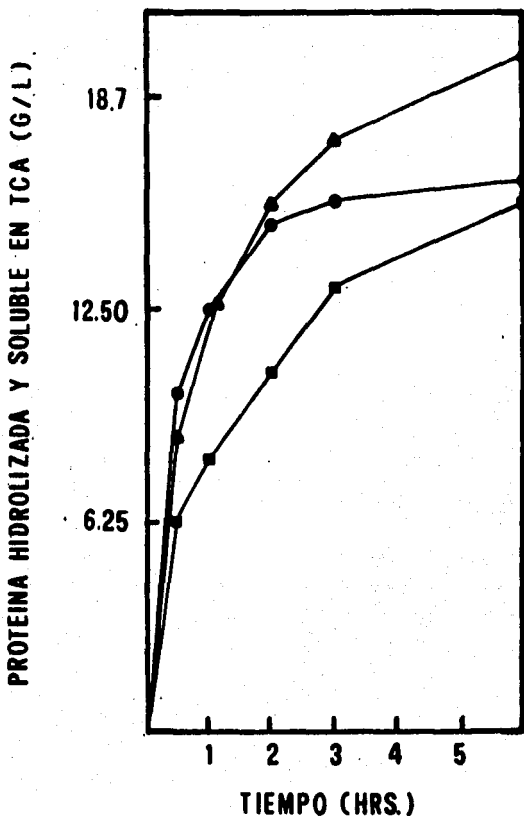


Figura 10.- Hidrólisis de músculo de pescado fresco (*Basilichthys argenteus*) sometido a ebullición durante 10 min (Δ); 15 min (⊕) y sin pretratamiento (⊙) con la preparación "BR" en buffer de fosfatos 0.2 M de pH 7.0 incubados a una temperatura de 30°C y 200 rpm, concentración de sustrato 286.0 g/l, concentración de enzima 1.67 g/l, relación E/S=0.005.

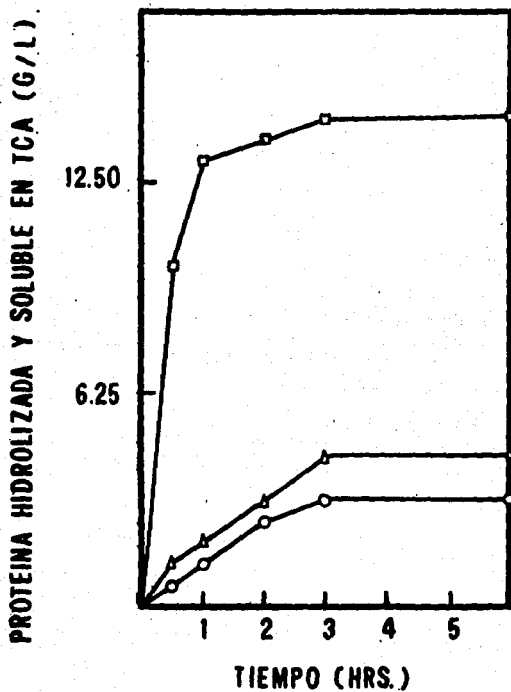


Figura 11. Hidrólisis de un ácido de pescado sin secar (□); secado a 70°C (Δ) y homogeneizado (○), con la preparación ER^o en buffer de fosfatos 0.2 M, pH 7.0 a 50°C y 200 rpm, relación R/S=0.005.

Con el fin de tener más información para el diseño del proceso se procedió a extraer con hexano, tanto el sustrato secado a 70°C como el liofilizado, para posteriormente usarlos como sustrato para la solubilización por vía enzimática. En la figura 12 se muestran los resultados obtenidos. En estas gráficas se puede observar que ninguno de los materiales secados y extraídos fueron susceptibles de ser hidrolizados en la misma proporción que en el sistema de ensayo descrito con anterioridad. Esto es una evidencia de que la baja liberación de proteínas hidrolizada soluble en TCA por acción enzimática es debido principalmente a la modificación de las proteínas presentes, provocado por el tratamiento térmico sin importar el material que sea usado como sustrato ni el porcentaje de grasa que contenga. Cabe señalar que en literatura solo se menciona que son mejores los pescados magros para realizar la hidrólisis por vía enzimática sin aportar datos experimentales.

4) Efecto de la agitación sobre la velocidad de hidrólisis.

Cuando se evaluó el efecto de la agitación sobre la hidrólisis de la proteína presente en músculo de pescado, figura 13, se encontró que la velocidad inicial del sistema se incrementa conforme la velocidad de agitación se va aumentando en el intervalo de 100 a 200 rpm, obteniéndose el valor máximo de velocidad (73.0×10^{-3} g/l/min) a 200 rpm, un incremento de 50 rpm provocó un decremento en la velocidad inicial hasta un valor de 48.0×10^{-3} g/l/min, igualmente las máximas concentraciones de proteína hidrolizada soluble en TCA se obtuvieron a 150 y 200 rpm. Este último valor fue escogido para experimentos posteriores, por haberse logrado con él la máxima concentración de proteína hidrolizada soluble en TCA, 17.75 g/l

HI-DROLISIS DE LA PROTEINA DE MUSCULO DE PESCADO EN REACTOR DE CINCO LITROS.

Como lo que se pretende es el diseño de un proceso para obtener hidrolizados de proteína de pescado era necesario evaluar el comportamiento del sistema en un reactor que nos permitiera tener información para llevar el proceso a un mayor volumen de trabajo.

Con esta idea se realizó una transferencia del volumen de ensayo en matraz de 125 ml con 60.0 ml de trabajo a un reactor con un volumen nominal de 5 litros y un volumen de trabajo de 3 litros en el que se usó buffer de fosfatos 0.2M de pH 7.0 y una concentración de sustrato del 33.0% conservando la relación enzima/sustrato de 0.003, esto quiere decir el reactor se manejó con el doble de la concentración de sustrato usado en los matraces. En estas condiciones se presentaron problemas para mantener el sistema homogéneo, ya que el material se acumuló en los baños con que está adaptado el reactor así como en la parte inferior del mismo.

En la figura 14 se presentan los resultados obtenidos. En este caso se cuantificó la Proteína soluble total y la proteína hidrolizada soluble en TCA total, también se incluyó un control en el que se evaluó la proteína soluble en TCA liberada en ausencia de la preparación enzimática "BR".

PROTEINA HIDROLIZADA Y SOLUBLE EN TCA (G/L)

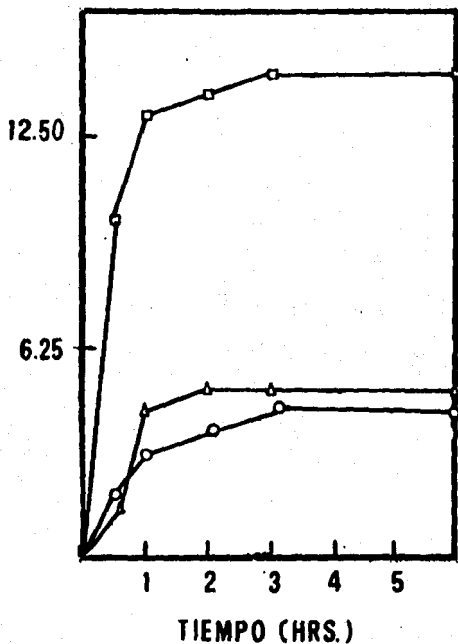


Figura 12. Hidrólisis de músculo de pescado fresco (□); liofilizado y extruido con benceno (○); secado a 70°C y extruido con benceno (△); con la preparación "BR" en buffer de fosfatos 0.2 M de pH 7.0 a 50°C y 200 rpm, relación E/S=0.005.

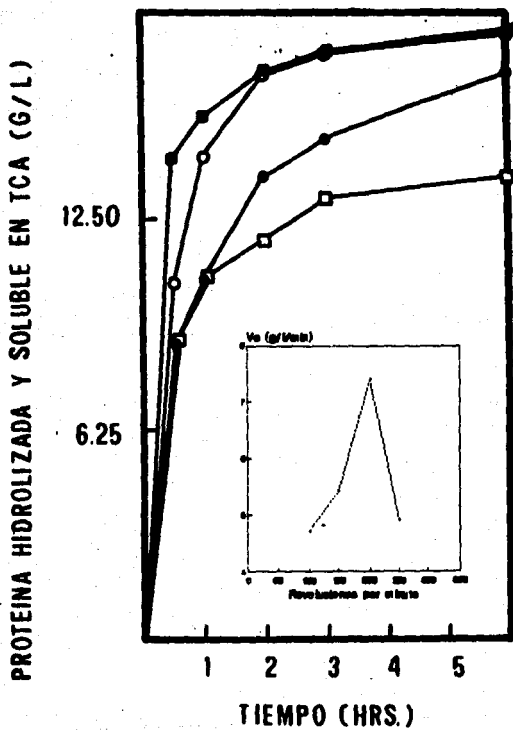


Figura 13.- Hidrólisis de la proteína de músculo de pescado fresco (*Eucinostomus argenteus*) con la preparación "BR" en buffer de fosfatos 0.2M de pH 7.0 a una temperatura de 50°C y agitación de 100 rpm (●); 150 rpm (○); 200 rpm (■) y 250 rpm (□), concentración de sustrato 286.0 g/l, concentración de enzima 1.67 g/l, relación E/S = 0.005.

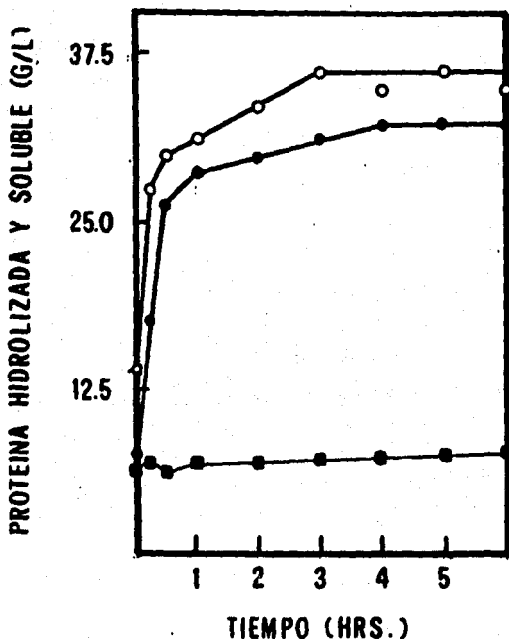


Figura 14. Hidrólisis de músculo de pescado fresco, mojarra, en reactor de 5.0 litros con un volumen de trabajo de 3.0 litros con el 33.0 % de sustrato con la preparación BR' en buffer de fosfatos 0.2M de pH 7.0 a 30°C y 200 rpm, relación E/S = 0.005.

Proteína soluble total (O)

Proteína soluble en TCA (●)

Proteína soluble en TCA del control sin enzima (■).

Como puede verse la diferencia más grande entre la proteína soluble total y la proteína hidrolizada soluble en TCA total se tiene a los 15 minutos de hidrólisis, en este momento el 67.0% de la proteína soluble total es proteína hidrolizada soluble en TCA, es decir una mezcla de aminoácidos libres y péptidos de bajo peso molecular, a los 30 minutos este porcentaje aumenta hasta un 87.4% conservándose en valores muy cercanos durante el resto del proceso.

HIDROLISIS DE PROTEINA DE MUSCULO DE PESCADO EN REACTOR DE 14 LITROS.

En iguales condiciones de trabajo se probó el sistema en un reactor de 14 litros de volumen nominal y 10 litros de volumen de trabajo, se midió la concentración de proteína hidrolizada soluble en TCA, encontrándose un comportamiento similar. Es decir obteniendo 37.0 g/l de proteína hidrolizada soluble en TCA.

En este caso la presencia de zonas estancadas en el reactor se minimizó por lo que es de esperarse que a volúmenes mayores este problema deje de existir.

DIAGRAMA DE FLUJO PROPUESTO.

Teniendo como antecedentes la información obtenida hasta este momento, se diseñó el diagrama de flujo de un posible proceso para la producción de hidrolizados de proteína de pescado, figura 13. En éste se contempla obtener 3 productos, uno insoluble en agua, básicamente sólidos finos de tipo proteico; una harina de escamas y espinas y un producto altamente soluble en agua, constituido por péptidos de bajo peso molecular, aminoácidos libres y proteínas solubles.

El análisis bromatológico de los productos obtenidos en el laboratorio se da en la Tabla XII, en ella podemos observar que con excepción del material insoluble obtenido cuando se usó como materia prima pescado entero, todos poseen un buen porcentaje de proteínas.

También se observa que la fracción gruesa se concentra básicamente en el material insoluble obtenido por filtración, esto puede resultar interesante para recuperar el aceite de pescado.

Al nivel estudiado, y con el 33.0% de sólidos iniciales en el sistema, fueron evidentes zonas estancadas en el reactor, provocadas por el acumulamiento de músculo de pescado en las mamparas, impulsores y zonas bajas del reactor, por esta razón no se evaluaron concentraciones de sustrato más altas.

Por lo tanto las condiciones de trabajo que se fijarán son; amortiguador de fosfatos 0.20 M de pH 7.0 con el 33.0% de sustrato fresco (músculo de pescado o flama de acompañamiento) sin tratamiento alguno, conservando una relación enzima/sustrato de 0.005 es decir 5.0 gramos de enzima por kilogramo de material fresco, el tiempo de procesamiento se fijó en tres horas, con el fin de obtener el porcentaje más alto de

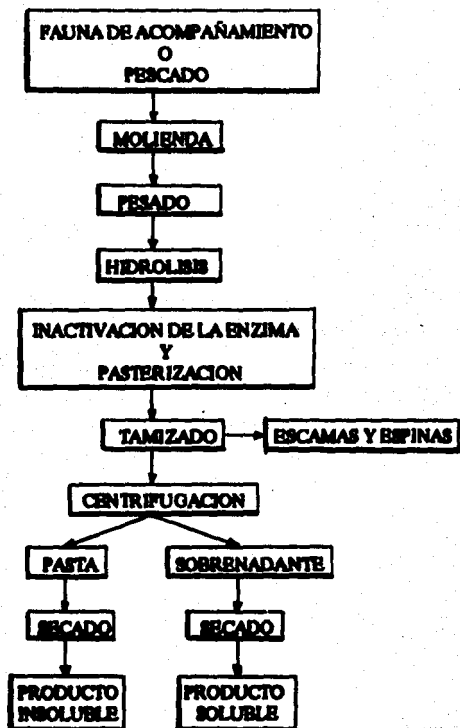


Figura 15.- Diagrama de flujo del proceso de producción de hidrolizados de proteínas de pescado.

TABLA XII**ANALISIS BROMATOLOGICO DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS DURANTE LA HIDROLISIS DEL MUSCULO DE PESCADO.**

	MATERIAL SOLUBLE	MATERIAL INSOLUBLE	ESCAMAS Y ESPINAS
HUMEDAD	7.85	1.30	4.60
PROTEINA	78.90	51.63	41.60
CENIZAS	7.20	19.90	40.90
LIPIDOS	5.03	27.17	15.00

solubilización de la fracción proteica; sin embargo éste puede ser modificado de acuerdo con las características esperadas en el producto.

Posterior a la hidrólisis se contempla un tratamiento térmico que sirva para inactivar la enzima y bajar la carga microbiana en el producto.

BALANCE DE MATERIALES DEL PROCESO PROPUESTO A NIVEL DE 14 LITROS.

El balance de materiales siguiendo este diagrama de bloques se realizó tanto para el músculo de pescado como para el pescado entero en corridas realizadas en el reactor de 14 litros, en las que se realizó el tratamiento térmico en un recipiente de acero inoxidable, las escamas y espinas se recuperaron en tamiz de 20 mallas, el hidrolizado se recuperó por filtración y en cada una de las etapas se evaluó la cantidad de sólidos recuperados así como el contenido de proteína de cada fracción, con el fin de realizar el balance de materiales en términos de sólidos totales y de proteínas; figuras 16 y 17.

En el caso en que se usó músculo de pescado se logró recuperar el 96.0% de los sólidos totales iniciales, y el 94.1% de la proteína total, tabla XIII. Cuando se usó pescado entero se recuperó el 98.2% de los sólidos totales y el 87.8% de la proteína total, tabla XIV, como se ve, en ambos casos se lograron buenos porcentajes de recuperación.

CARACTERIZACION DEL HIDROLIZADO DE PROTEINA DE PESCADO.

a) Relación porcentual de pesos moleculares.

Con el fin de distinguir si los productos obtenidos a diferentes tiempos de procesamiento, tenían la misma relación porcentual de pesos moleculares, se realizaron separaciones en tamiz molecular, usando Sephadex G-15, de hidrolizados obtenidos a las 3, 6, 18 y 24 horas, obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 18.

Es obvio que en cada muestra la distribución de pesos moleculares es diferente, en la tabla XV se dan los porcentajes obtenidos, estos se calcularon tomando como referencias cromatogramas de calibración en los que se usaron como referencias; Gistatina (P.M. = 307.3), Tirosina (P.M. = 181.2) y Triptófano (P.M. = 204.2).

Como puede verse en el hidrolizado obtenido en tres horas, la fracción I representa el 94.29% del total de las moléculas presentes en el mismo, y esta fracción está compuesta por moléculas de bajo peso molecular, y a tiempos más largos van apareciendo fracciones que corresponden a aminoácidos libres.

Los resultados obtenidos dejan abierta la posibilidad de obtener productos con diferentes grados de hidrólisis, y en consecuencia, con diferentes aplicaciones.

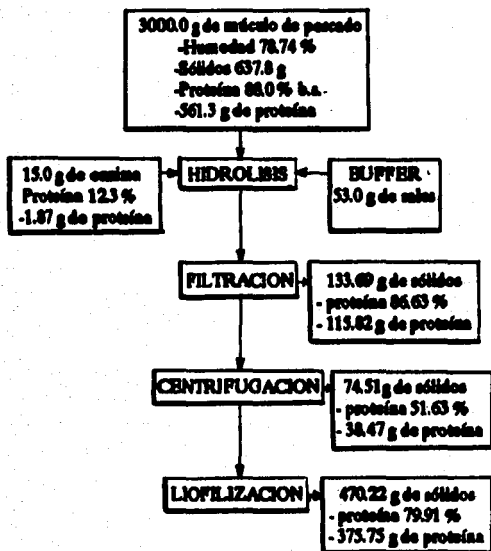


Figura 16.- Balance de materiales del sistema de hidrólisis de proteína de músculo de pescado.

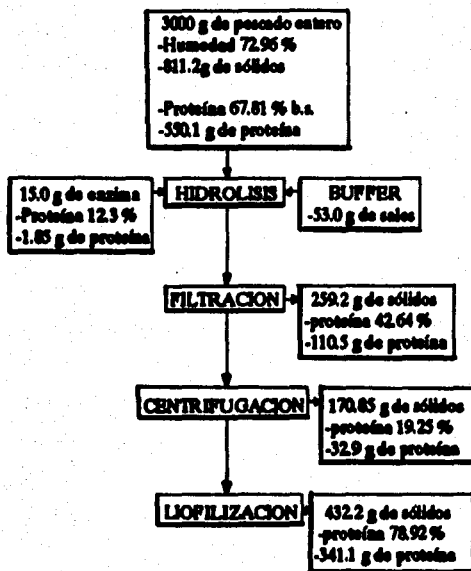


Figura 17.- Balance de materiales del sistema de hidrólisis de proteína de pescado entero.

TABLA XIII**BALANCE DE MATERIALES DEL PROCESO DE HIDROLISIS DE PROTEINA DE MUSCULO DE PESCADO.**

	SOLIDOS TOTALES		PROTEINA TOTAL	
	Peso (g)	Porcentaje	Peso (g)	Porcentaje
MATERIAS PRIMAS	705.80	100.00	563.20	100.00
FILTRACION	133.70	18.90	115.80	20.60
CENTRIFUGACION	74.50	10.60	38.50	6.80
LIOFILIZACION	470.20	66.60	375.80	66.70
RECUPERACION	678.40	96.10	530.10	94.10

TABLA XIV**BALANCE DE MATERIALES DEL PROCESO DE HIDROLISIS DE PROTEINA DE PESCADO ENTERO.**

	SOLIDOS TOTALES		PROTEINA TOTAL	
	Peso (g)	Porcentaje	Peso (g)	Porcentaje
MATERIAS PRIMAS	879.20	100.00	551.95	100.00
FILTRACION	299.20	29.50	110.50	20.00
CENTRIFUGACION	170.90	19.40	32.90	6.00
LIOFILIZACION	432.20	49.20	341.10	61.80
RECUPERACION	862.30	98.20	484.90	87.80

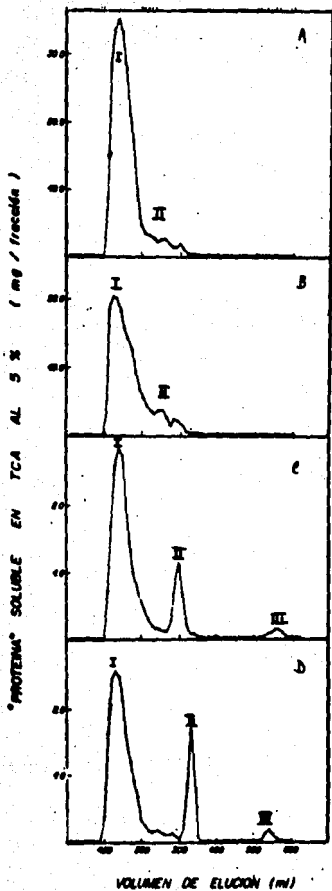


Figura 18. Cromatograma en sephadex G-15 de hidrolizados obtenidos en tres horas (A); seis horas (B); dieciocho horas (C) y 24 horas (D) en columna de 2.5 x 57.0 cms empacada con 302.0 ml de resina equilibrada con buffer de fosfatos 0.02 M de pH 7.0 y velocidad de flujo de 100.0 ml/h.

TABLA XV

DISTRIBUCION PORCENTUAL DE PESOS MOLECULARES EN MUESTRAS DE DIFERENTES TIEMPOS DE PROCESAMIENTO CROMATOGRAFIADAS EN SEPHADEX G-15

FRACCION	MUESTRA			
	A	B	C	D
I	94.29	90.16	80.38	76.51
II	5.70	9.84	17.09	21.27
III	0.00	0.00	2.53	2.22

I) Fracción de péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres.

II) Tirosina.

III) Triptófano.

A) Muestra de tres horas.

B) Muestra de seis horas.

C) Muestra de dieciocho horas.

D) Muestra de veinticuatro horas.

Lalasis (1978) encontro el mismo comportamiento cuando realizo estudios similares, en cephalop G-10, con hidrolizados obtenidos a partir de pescado entero usando papaína para realizar la hidrólisis.

h) Perfil de aminoácidos.

Uno de los motivos que nos movieron a realizar estos estudios, fue el obtener un producto que ademas de ser altamente soluble en agua, conservara su calidad nutritiva, en este caso un buen perfil de aminoácidos.

En la tabla XVI se muestra el aminograma del hidrolizado de músculo de pescado, y se compara con los de la caseína y el estandar recomendado por la FAO/WHO. Observándose que el nivel de aminoácidos presentes en el hidrolizado de músculo de pescado compara de forma adecuada con los patrones internacionales.

c) Solubilidad del hidrolizado asimétrico de proteína de músculo de pescado.

En la figura 19 se muestra la solubilidad del hidrolizado recuperado por liofilización en valores de pH que van de 5.0 a 8.0, mismos que se cubrieron usando amortiguador de citratos y amortiguador de fosfatos.

En la figura se puede observar que en los sistemas con pH 5.0 y 6.0 se logró solubilizar entre el 70.0 y 80.0 por ciento del material en concentraciones que van de 50.0 a 170.0 gramos por litro, también es claro que en los sistemas con pH 7.0 y 8.0 se logra un ligero incremento en el porcentaje de solubilidad, esto deja abierta la posibilidad de usar este material para complementar alimentos cuyo pH este entre 5.0 y 8.0, pudiendo manejar concentraciones elevadas del hidrolizado; por otro lado la posibilidad de usar este producto, como fuente de carbono y de nitrógeno, en la formulación de medios de cultivos para fermentación queda abierta.

HIDROLISIS DE FAUNA DE ACOMPAÑAMIENTO CON LA PREPARACIÓN "BR" EN CONDICIONES OPTIMIZADAS.

Una vez que se establecieron las condiciones de trabajo con la preparación "BR", en amortiguador de fosfatos 0.2 M de pH 7.0, a 50°C y 200 rpm, usando como sustrato músculo de pescado. Se procedió a evaluar la hidrólisis de la fauna de acompañamiento del camarón, procedente del Golfo de California.

La fauna de acompañamiento se usó sin eviscerar y sin descabezar, simplemente se molió en igual forma que el músculo de pescado, con el fin de aumentar la superficie de contacto.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 20, en ésta se puede observar que con el sistema desarrollado usando músculo de pescado, (*Encinostomus argenteus*), se obtuvieron 18.13 g/l de proteína hidrolizada soluble en TCA en tres horas, cuando se usó

TABLA XVI

ANÁLISIS COMPARATIVO DEL AMINOGRAMA DEL HIDROLIZADO DE MUSCULO DE PESCADO (*Basilichthys argenteus*)

g de aminoácido/100 g de proteína

AMINOACIDO	HMP-GRM	CASEINA	ESTANDAR FAO/WHO
Ac. aspártico	10.91	6.30	7.70
Treonina*	4.07	4.30	4.00
Serina	7.36	5.60	7.70
A. glutámico	10.25	20.00	14.70
Prolina	6.31	10.10	10.70
Glicina	6.18	2.40	2.20
Alanina	6.70	2.60	6.10
Cistina	1.31	.	1.69
Valina*	6.44	6.40	5.00
Metionina*	3.29	2.50	.
Isolecina*	3.81	5.40	4.00
Leucina*	5.38	8.20	7.00
Tirosina	5.78	5.60	3.05
Fenilalanina*	5.26	4.40	3.05
Lisina*	4.73	7.30	5.40
Histidina	3.81	2.70	2.50
Arginina	4.86	3.60	5.20
Triptófano	1.7	.	1.00

* aminoácidos esenciales.

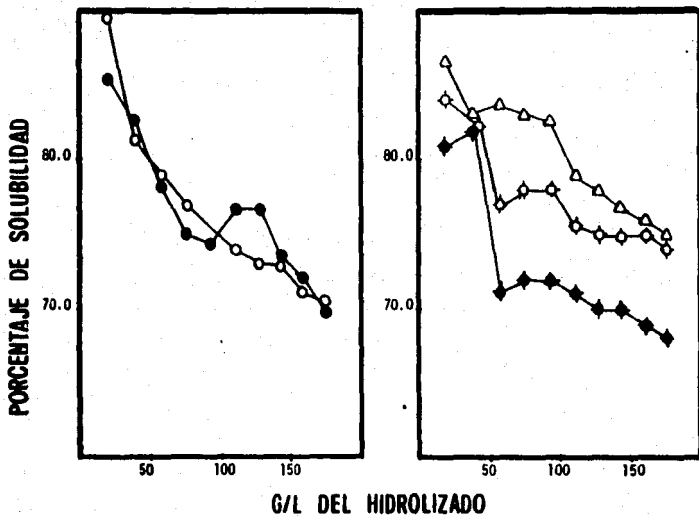


Figura 19. Solubilidad del hidrolizado enzimático de músculo de pescado en buffer de citratos 0.2 M de pH 5.0 (●); pH 6.0 (○), buffer de fosfatos 0.2 M de pH 6.0 (◆), pH 7.0 (◇) y pH (△) a 25°C.

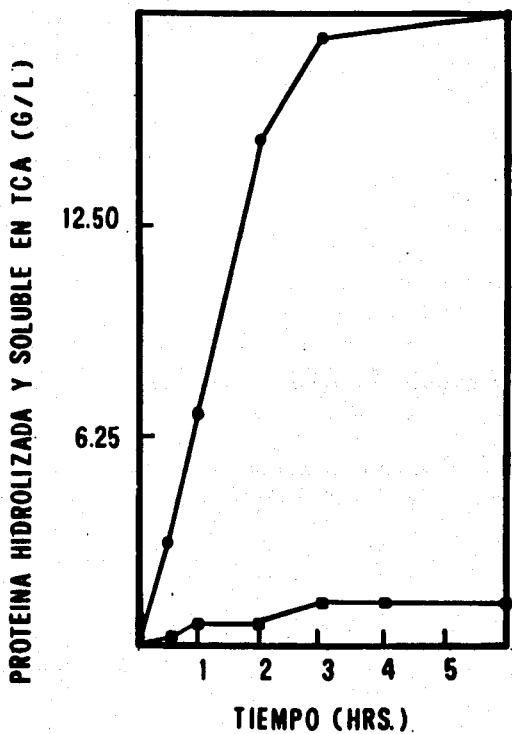


Figura 20.- Hidrólisis de Fauna de acompañamiento integral, con la preparación "BR" (o) y sin enzima (■) en buffer de fosfatos 0.2 M de pH 7.0 a 30°C y 200 rpm, concentración de sustrato 285.0 g/l, concentración de enzima 1.67 g/l, relación E/S=0.005.

como sustrato fauna de acompañamiento. Esta concentración de proteína hidrolizada soluble en TCA fué 16.2 % más alta que la obtenida en promedio cuando se usó como sustrato músculo de pescado, 15.6 g/l. En ambos sistemas se usaron 167.0 g/l de sustrato inicial.

Como puede verse, el sistema desarrollado usando músculo de mojarra (*Eucinostomus argenteus*) presenta el mismo comportamiento cuando se usa como sustrato fauna de acompañamiento. Es necesario enfatizar que durante el desarrollo de este trabajo se evaluó en todos los casos la proteína hidrolizada soluble en TCA, y que esta para el caso del músculo de pescado, representa el 87.4 % del total de la proteína hidrolizada, figura 14, quiere decir que si asumimos que la fauna de acompañamiento se presenta la misma relación, tendríamos en realidad 20.93 g/l de proteína hidrolizada.

Como se señaló en la introducción, existe un solo trabajo en el que se usa como sustrato fauna de acompañamiento para obtener hidrolizados proteicos (Thamkama, 1979). En este estudio se usó papaína a 55°C, y se demostró que con esa enzima se hidrolizan tanto los pescados por separado, como la mezcla de ellos.

En nuestro caso logramos tener un sistema que nos permite hacer uso de la fauna de acompañamiento como materia prima, para la producción de hidrolizados proteicos, haciendo uso de una enzima de origen microbiano mismas que son abundantes, están disponibles y son fabricadas en México.

Es importante señalar que debido a que en su momento, no fué posible conseguir una muestra de fauna de acompañamiento, no se realizaron estudios con este sustrato a nivel de reactor de 5 y 14 litros, pero dados los resultados obtenidos es de esperarse que el comportamiento sea similar a el obtenido con músculo de pescado.

CONCLUSIONES.

a) En este trabajo se logró establecer una metodología para recuperar en forma de un hidrolizado enzimático, la proteína presente en la fracción de pescado de la línea de acompañamiento y un pescado de desecho.

b) Para el desarrollo del proceso se seleccionó una proteasa neutra de *Bacillus subtilis* producida por ENMEX S.A. misma que actualmente se usa en la industria conservera.

c) El sistema en el que se logra un mejor comportamiento requiere usar una solución amortiguadora de fosfatos 0.2 de pH 7.0.

d) Las condiciones de trabajo más adecuadas fueron; temperatura de 37°C y agitación de 200 rpm.

e) En el máximo volumen de trabajo manejado, 100 litros, con el 33.0 % de úsculo de pescado, se obtuvo el máximo de proteína hidrolizada soluble en TCA en tres horas.

f) No es recomendable realizar ningún tipo de pretratamiento del sustrato, ya que se observó que el contenido de grasas no interfiere con la actividad de la enzima, y por otro lado el tratamiento térmico además de consumir energía, provoca la pérdida de eficiencia del sistema.

g) El producto obtenido y recuperado por liofilización, tiene una solubilidad alta en agua, que fluctúa entre el 70.0 y 90.0 por ciento dependiendo de la concentración de hidrolizado usado y del pH del sistema.

h) El perfil de aminoácidos del producto obtenido a partir de úsculo de mejillón (*Modiolus matronalis*) se compara favorablemente con los estándares internacionales de proteína.

RECOMENDACIONES.

- a) Una limitante encontrada en los ensayo realizados en reactor de 5 y 14 litros, es la imposibilidad de manejar concentraciones más altas de sustrato, debido al bloqueo de las líneas, por esta razón se sugiere evaluar en un reactor más grande la posibilidad de aumentar la concentración de sólidos iniciales en el sistema.
- b) En este trabajo se recuperó el hidrolizado por liofilización, sistema que no sería adecuado para el nivel industrial, por lo que es necesario establecer las condiciones de secado, así como evaluar la necesidad de adicionar compuestos, para aumentar el volumen específico del producto.
- c) Si este desarrollo se logra llevar a nivel industrial, es necesario seleccionar el equipo más adecuado para realizar cada una de las operaciones unitarias involucradas en el diagrama de flujo propuesto.

REFERENCIAS

Amezua-Linares, F. "Recursos potenciales de peces capturados con redes camaroneras en la costa del Pacífico de México." en Recursos pesqueros potenciales de México: la pesca acompañante del camarón por Yañez-Arancibia, A., UNAM, México, 39-94 (1985).

Archer, M.C., Ragnarsson, J.O., Tannenbaum, S.R. and Wang, D.I.C. "Enzymatic solubilization of an insoluble substrate, fish protein concentrate: process and kinetic considerations." *Biotechnol. and Bioeng.* 15; 181-195 (1973).

Archer, M.C., Stillings, B.R., Tannenbaum, S.R. and Wang, D.I.C. "Reduction in mercury content of fish protein concentrate by enzymatic digestion." *J. Agric. Food Chem.* 21 (6); 1116-1117 (1973).

Boddows, C.G., Ismail, M. and Steinhilber, K. "The use of bromelain in the hydrolysis of mackerel and the investigation of fermented fish aroma." *J. Food Technol.* 11; 379-388 (1976).

Boddows, C.G. and Ardesair, A.G. "The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce manufacture." I. The use of added enzymes." *J. Food Technol.* 14; 605-612 (1979).

Ehemibhomon, O. "Enzymic solubilization of fish protein." *Thal. J. Agric. Sci.* 16 (2); 107-114 (1983).

Rejorquez, L. "Procesos para el aprovechamiento de las especies de la fauna de acompañamiento." memorias de la "Reunión nacional para el aprovechamiento de la fauna de acompañamiento del camarón." Oaxaymas, Sonora, México. (1979).

Chávez, H. y Arvín, J. "Estudio de los recursos pesqueros demersales del Golfo de California 1998-1999. III. Fauna de acompañamiento del camarón (peces blancos y blancos)." memorias del "TV Congreso Nacional de Oceanografía." México, 361-370 (1989).

Chu, N.T., Pellett, P.L. and Newar, W.W. "Effect of alkali treatment on the formation of histocyanine in corn." *J. Agric. Food Chem.* 24 (5); 1084-1085 (1976).

Dalby, A. and Tsai, Ch. Y. "Acetic anhydride requirement in the colorimetric determination of tryptophan." *Analytical Biochemistry* 63; 283-285 (1975).

Friedman, M., Zahaley, J.C. and Masters, P.M. "Relationship between in vitro digestibility of casein and its content of lysinealanine and D-aminoacids." *Journal of Food Sciences* 46; 127-131 (1981).

Fujimaki, M., Arai, S., Yamashita, M., Kato, H. and Noguchi, M. "Taste peptide fractionation from a fish protein hydrolysate." *Agricultural and Biological Chemistry* 37 (12); 2891-2898 (1973).

Hale, M.B. "Relative activities of commercially available enzymes in the hydrolysis of fish protein." *Food Technol.* 23; 107-110 (1969).

Hale, M.B. "Making fish protein concentrates by enzymatic hydrolysis." NOAA Technical Report NMFS-389-457 (1972).

Herbert, W. and Allsopp, L. "La fauna acompañante del camarón perspectivas y manejo." en "Recursos pesqueros potenciales de México; la pesca acompañante del camarón por Yafes-Aranda, A. (Ed.) UNAM, México, 635-643 (1985).

Hovis, F., Whitaker, J.R. and Ottett, H.S. "Solubilization of fish protein concentrate with proteolytic enzymes." *J. Agric. Food Chem.* 24 (2); 363-365 (1976).

I.A.O.A.C. "Official methods of analysis of association of official agricultural chemists." 11 th. ed., Washington, D.C., USA (1970).

Kinoshita, T. "The economics marketing and technology of fish protein concentrates." in "The economics marketing and technology of fish protein concentrate." by Tannenbaum, S.R., Sellings, B.R. and Srinshaw, N.S. 125-130, The MIT Press, Cambridge, Mass. (1974).

Kraft, Inc. "Hydrolyzed proteins" folleto de difusión Sheffield Products P.O. Box 398, Memphis, Tennessee 38101.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Lalasidde, G., Bostrom, S. and Sjoberg, L.B. "Low molecular weight enzymatic fish protein hydrolysates: chemical composition and nutritive value." *J. Agric. Food Chem.* 26 (3); 751-756 (1978)

Langmyhr, E. "Enzymatisk hydrolyse av fiskeprotein." Avhandling for graden Doktor Ingenior ved Norges Tekniske Høgskole Universitetet; Trondheim, (1981).

Lardon, R. and Harrell, R.F. "Amino acid racemization in heated and alkali-treated proteins." *J. Agric. Food Chem.* 31; 432-437 (1983).

Limonta, B.A., Behrke, U. and Rattloff, H. "Manufacture of fish protein hydrolysate." German Democratic Republic patent 148437 (1981).

Lin Liu, L. and Pigott, G.M. "Preparation and use of inexpensive crude pepsin for enzyme hydrolysis of fish." *Journal of Food Science* 46; 1569-1572 (1981).

Lowry, O.M., Rosebrough, M.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. "Protein measurement with the folin phenol reagent." *J. Biol. Chem.* 193; 265-275 (1951).

Mackie, I.M. "Fish protein hydrolysates." *Process Biochemistry*, Jan/Feb; 26-31 (1982).

Masters, P.M. and Friedman, M. "Racemization of amino acids in alkali-treated food proteins." *J. Agric. Food Chem.* 27 (3); 907-910 (1979).

McLaren, A.D. "Enzyme reactions in structurally restricted systems IV. The digestion of insoluble substrates by hydrolytic enzymes." *Enzymologia* 26; 237-246 (1963).

Miller, R., Spinelli, J. and Babbitt, J.K. "Effect of heated alkali on lysinoalanine formation in fish muscle." *Journal of Food Science* 48; 296-297 (1983).

Mosteacalvo, J., Constantiades, S.M. and Vang, C.S.T. "Enzymatic modification of fish protein isolates." *Journal of Food Science* 49; 1305-1309 (1984).

Nunes, M.L. "Hydrolysis of fish protein to a functional product." UNICAMP, informativo anual da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, 10; 23-27 (1982).

Ooshiro, Z., Perez-Won, M., Nakagawa, S., Itakura, T. and Hayashi, S. "Approches to use of plasma reaction in oily fish: Preparation and caracterizacion of plasma products." Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ. 30; 369-382 (1981).

Ortiz, F. "La pesca en México." Fondo de cultura económica, Colección testimonios del fondo 31; (1975).

Pastoriza, I., Sampedro, G., and López-Balito, M. "Effect of preparation procedure on characteristics of protein hydrolysates obtained from saurel (*Trachurus trachurus*, L.) Inf. Tec. Inst. Invest. Pesq., Barcelona, 98; 3-11 (1982).

Popov, N.I. and Petrova, I.S. "Hydrolysis of proteins in Sperm-Whale meat by preparation of proteolytic enzymes from *Actinomyces fridiae* 119." Prikladnaya Biokhimiya mikrobiologiya." 13(1); 79-83 (1977).

Productos Pesqueros Mexicanos, S.A. de C.V. "Industrialización de la fauna de acompañamiento en Productos Pesqueros Mexicanos, S.A. de C.V." Mem. Reunión Nacional para el aprovechamiento de la Fauna de acompañamiento del camarón. Guaymas, Sonora, México (1979).

Ritchie, A.H. and Machie, I.M. "Preparation of fish protein hydrolysates." *Animal Feed Science and Technology* 7; 123-133 (1982).

Ratman, M. and Heimlich, W. "The fish protein hydrolysate (FPH) process. A target design approach." in "The economics, marketing and technology of fish protein concentrate." by Tannenbaum, S.R., Stirling, B.R. and Swinshaw, N.S. 135-145 The MIT press, Cambridge, Mass. (1974).

SFP "Anuario estadístico pesquero del Departamento de Pesca." México (1978).

SFP "Anuario estadístico pesquero del Departamento de Pesca." México (1980).

SFP "Anuario estadístico pesquero del Departamento de Pesca." México (1981).

Terty, O. W., Agarwala, O.P. and Piggot, G.M. "Protein Hydrolysate from fish waste." *J. Food Science* 38; 917-920 (1973).

Terty, O.W. y Dondero, M. "Utilización de desperdicios de origen marino. Hidrólisis de desperdicios de Merluza (*Merluccius gayi*).^o Consulta técnica sobre la industria de la merluza en América Latina FAO, Montevideo, Uruguay. 24-28/10(1977)."

Theakuma, R., Gopakumar, K., Leishay-Nair, A., Shenoy, AV and James, M.A. "Protein hydrolysate from miscellaneous fish." *Fish. Technol.* 16; 71-75 (1979).

Warrier, S.B. and Ninjoor, V. "Fish protein concentrate (FPC) from Bombay Duck isolated by radiation-heat combination procedure: functional and nutritional properties." *Journal of Food Science* 46; 234-238 (1981).

Van der Heiden, A.M. "Taxonomía, biología y evaluación de la ictiofauna demersal del Golfo de California." en "Recursos pesqueros potenciales de México; la pesca acompañante del camarón." por Yañez-Arancibia, A. UNAM, México, 149-200 (1985).

Yañez-Arancibia, A. "Evaluación de la pesca demersal costera." *Ciencia y Desarrollo, CONACYT, México, Sep-Oct, 58; 61-71 (1984).*

Yañez E., Ballaster, D., Moncheberg, F., Helmlich, W. and Rutman, M. "Enzymatic Fish protein hydrolysate: chemical composition, nutritive value and use as a supplement to cereal protein." *Journal of Food Science* 41; 1289-1292 (1976).